
3.3 Untersuchung des Einflusses der Konformation von Met45 auf die proteolytische Aktivität des Proteasoms

Der Inhalt dieses Kapitels wird 2014 zur Veröffentlichung eingereicht.

Christoph Scholz, Constantin Voss, Sabine Knorr, Ulrike Kuckelkorn, Kay Hamacher, Peter-Michael Klotzel, Boris Schmidt, "Paradigm Caught by a Mouse Trap. 20S Proteasome's $\beta 5$ Subunit is Not Chymotrypsin-like."

Das Design neuer Proteasominhibitoren mit erhöhter Selektivität gegenüber der $\beta 5$ -Untereinheit erfordert kristallographische Strukturinformationen in Kombination mit computergestütztem Molekularem Modelling, sowie die genaue Kenntnis des Hydrolysemechanismus auf molekularer Ebene. Die Analyse von Inhibitoren im Komplex mit isoliertem Proteasom anhand kristallisierter Strukturen erlaubt als Momentaufnahme nur bedingt Einblicke in die dynamischen Abläufe kurz vor der Substratbindung. Kinetische Vermessung sog. *induced-fit*-Mechanismen kann durch ligandenbasierte Zugänge realisiert werden.

In der folgenden Arbeit wurde ein solcher *induced-fit*-Mechanismus am Proteasom postuliert, der durch hydrophobe Wechselwirkungen des P1-Restes eines Substrats mit Met45 der $\beta 5$ -Untereinheit eine Änderung der Konformation auslöst und über ein vermittelndes Wassermolekül die Nukleophilie von Thr10^y signifikant steigert. Diese komplex erscheinende Hypothese lässt sich mit folgendem Gedankenexperiment vergleichen: Das im Bindungskanal befindliche Substrat des Proteasoms verhält sich dabei wie eine Maus, die sich dem Metallbügel einer Mausefalle (Thr10^y) nähert. Der P1-Rest dieses Substrats interagiert mit der nahegelegenen Aminosäure Met45, vergleichbar mit einem Schnappen der Maus nach dem Köder der Falle. Der Kontakt des Substrats zu Met45 löst den nukleophilen Angriff von Thr10^y auf das Substrat aus bzw. löst der Kontakt der Maus zum Köder den Schlagmechanismus der Falle aus. Um diesen postulierten Mechanismus zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Aldehyd-basierte Inhibitoren mit besonderer Selektivität gegenüber der betrachteten $\beta 5$ -Untereinheit wurden mit unterschiedlich langen P1-Resten synthetisiert und *in vitro* an isoliertem Proteasom getestet. Im Vergleich der IC₅₀-Werte war ein deutlicher Aktivitätssprung von P1 = Methyl zu P1 = Ethyl zu erkennen, was aus rein thermodynamischer Berechnung der relativen freien Bindungsenthalpie nicht erklärbar war. Die Beobachtung ist demnach ein Effekt kinetischer Natur und kann anhand des postulierten *induced-fit* Mechanismus, der ab einer P1-Länge von zwei Alkyleinheiten (Ethyl) ausgelöst wird, erklärt werden. Eine Simulation der Molekulardynamik über 50 ns

unterstützte diesen Befund, indem die native Struktur des Proteasoms mit Inhibitor-gebundenen Proteasom-Komplexen verglichen wurde. Die ausgeprägte Flexibilität von Met45 in der nativen Form wird durch Wechselwirkung der P1-verlängerten Inhibitoren deutlich eingeschränkt. Der logische Folgeschritt war die Durchführung einer kinetischen Studie, um die Dynamik dieses Befundes zugänglich zu machen. Dazu wurden Substrat-Mimetika, strukturell analog zu den Inhibitoren, synthetisiert, die anstelle der Aldehyd-Funktion ein fluoreszentes Aminocoumarin-Fragment tragen. Kinetische Experimente wurden klassisch nach Michaelis-Menten durchgeführt, um aus einer Lineweaver-Burk-Auftragung die charakteristischen, kinetischen Größen zu bestimmen. Die Interpretation dieser Kennzahlen stand im direkten Kontrast zu den vorigen Ergebnissen. Die Gesamtheit der Ergebnisse dieser Studie konnten den postulierten Mausfallen-Mechanismus nicht bestätigen, führten allerdings zur Wiederlegung eines weit verbreiteten Paradigmas. Die $\beta 5$ -Untereinheit des Proteasoms spaltet Substrate offensichtlich bevorzugt nach kleinen, neutralen Aminosäure-Resten (SNAAP) und nicht, nach der verbreiteten Auffassung, nach großen, verzweigten Resten (BrAAP). Dies widerspricht der etablierten Kategorisierung einer Chymotrypsin-artigen Aktivität der $\beta 5$ -Untereinheit und bekräftigt vereinzelte Arbeiten^[14, 88-89], die eine Klassifizierung Elastase-artiger Aktivität bevorzugen.

Beitrag C. Voss: Projektplanung, Synthese der fluoreszenten Substrate **5-6**, Durchführung der kinetischen Vermessung der Verbindungen **5-7** an isoliertem Proteasom *in vitro* (Nummer wie in Publikation).

Paradigm Caught by a Mouse Trap. 20S Proteasome's $\beta 5$ Subunit is Not Chymotrypsin-like.

Christoph Scholz, Constantin Voss, Sabine Knorr, Ulrike Kuckelkorn, Kay Hamacher, Peter-Michael Kloetzel and Boris Schmidt*

The proteome, the entirety of proteins in an organism at a given time, underlies a complex and dynamic equilibrium between protein synthesis and degradation. In eukaryotes, the ubiquitin/proteasome system (UPS) is the major ATP-dependent degradation pathway. Ubiquitin, a small 8 kDa protein, is covalently attached to a substrate, which is subsequently recognized and degraded to small fragments by the 26S proteasome.^[1] This 26S proteasome is a 2.5 MDa multicatalytical threonine protease complex that consists of two regulatory 19S subunits, which recognize and unfold ubiquitylated substrates, and a cylinder-shaped core particle (CP), the 20S proteasome, which harbours the active sites. The CP consists of 28 subunits with an $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ symmetry and features six active sites bearing three different substrate specificities: Classified as caspase-like activity (C-like, $\beta 1$) because of its tendency to cleave peptides on the carboxyl side of glutamyl or aspartyl sidechains, the trypsin-like activity (T-like, $\beta 2$) due to the cleavage after basic P1 residues and the chymotrypsin-like activity (ChT-like, $\beta 5$) which predominantly attacks the carboxyl side of aromatic or spacious hydrophobic residues.^[2] The observed specificities arise from the unique shape of the substrate binding pockets which are named S1-S4 in C-terminal and S1'-S4' in N-terminal direction of a bound substrate, emanating from its cleavage position which is the alcohol oxygen of Thr¹ (Thr¹O³). Ligand parts reaching the substrate binding pockets follow a similar nomenclature where S is substituted by P, respectively.

The UPS is involved in several physiologically important cellular processes such as cell cycle progression, immune response or signal transduction, which makes the CP an attractive therapeutic target for cancer and autoimmune disorders.^[3] In fact, the dipeptidic boronic acid bortezomib **SX** and the tetrapeptidic epoxyketone carfilzomib **SX** are currently prescriptive drugs against various types of cancer, in particular relapsed multiple myeloma and mantle cell lymphoma.^[4] Particularly the $\beta 5$ subunit is in the focus of therapeutic targeting, because its inhibition leads to high rates of apoptosis in tumor cells, which is accompanied by a protective effect on healthy cells.^[5] In 2005 we identified the tripeptidic aldehyde BSc2118 (**1**; Scheme 1 a) as a very potent ($IC_{50,\beta 5} = 58$ nM) and specific covalent CP inhibitor.^[6] The special feature of **1** is a sterically demanding tert.-butyl aspartate P2 residue, which

discriminates inhibition against the majority of the protease environment. In a recent study **1** showed a cytotoxic effect against human tumor cells. In fact, the determined therapeutic index (LD₅₀/ED₉₅) of **1** (26.5) in the cellular model is significantly higher than that of bortezomib **SX** (18.4), hence **1** was highly recommended for further preclinical evaluation.^[7]

Besides the proteasome's role in tumorigenesis, peptide fragments produced by the UPS can be presented by major histocompatibility complex (MHC) class I molecules, which makes the proteasome to a fundamental part of the adaptive immune system.^[8] Thus a detailed knowledge of the different substrate cleavage preferences and kinetics of respective proteasome subunits are of high interest not only for immunologists. This resulted in the development of several *in silico* methods for fragment prediction and shed light on the kinetics and mechanisms underlying the UPS-mediated degradation of proteins. These tools furthered the understanding of how different factors, such as the length of a substrate or the presence of regulatory molecules, influence proteolysis.^[9] However, due to the manifold events that occur inside the proteasome, some of them are not conclusively understood today, the prediction of these enigmatic cleavage patterns is still prone to errors.

In this work, we initially investigated a novel kinetically controlled substrate recognition mechanism, which could provide another fundamental piece of the UPS puzzle. Our hypothesis was that a kinetic acceleration of the hydrolytic cleavage arises from hydrophobic interactions between a substrate's P1 residue and the highly flexible sidechain of Met⁴⁵ within the proteasome's $\beta 5$ subunit. This extraordinary flexibility is well established.^[12] For example, in the bortezomib/proteasome complex (PDB-ID: 2F16) Met⁴⁵ shows a dihedral angle α of -174° compared to $+48^\circ$ in the native protein (PDB-ID: 1RYP).^[10] A concerted mechanism may accelerate the binding of substrates with large P1 residues due to a widening of the dihedral angle α of Met⁴⁵. This induced fit was thought to imply a conformational change of the S1 subpocket's backbone which would strengthen the coordination of a catalytically active water molecule through a network of hydrogen bonds and increase the nucleophilicity of Thr¹O^y. An illustrative analogy for this triggered activation is the release of a mouse trap after the mouse touches the lure (Scheme 1 b).

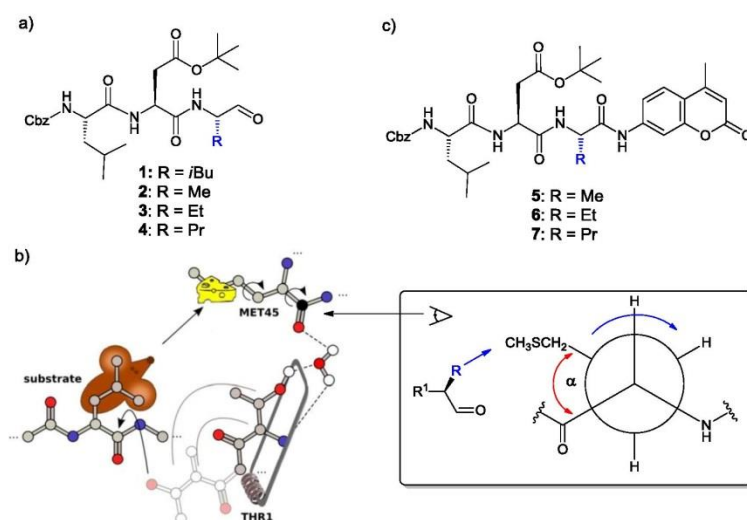


Figure 1: a) Chemical structures of the tripeptidic aldehyde inhibitor BSc2118 **1** and derivatives with elongated P1 residues **2-4**. b) Visualization of the kinetically activated mechanism as a mouse trap analogy. Hydrophobic interactions between Met⁴⁵ and the ligand's P1 residue lead to conformational changes of the S1 subpocket's backbone. This induced fit strengthens the coordination of a catalytically active water molecule through a network of hydrogen bonds and increases the nucleophilicity of Thr¹O'.

To gain detailed insights in the nature of the Met⁴⁵ flexibility, we performed a set of molecular dynamics simulations. Based on the crystal structure of yeast 20S proteasome in complex with **1**, three bound derivatives with iteratively enlarged P1 residues (**2-4**; Figure 1a) and the unbound state were simulated over a timescale of 50 ns (Figure 2a). As expected, the sidechain of Met⁴⁵ shows a high flexibility in absence of any ligand with an RMSD in the range of two to six angstroms. Surprisingly, the simulation with the methyl derivative **2** exclusively revealed a switch between two stabilized states. According to our hypothesis these two stabilized conformations of Met⁴⁵ were interpreted as an unactivated or activated kinetic acceleration, respectively, the latter being highly favored with P1 residues larger than a methyl group. This finding encouraged us to conduct a ligand-based approach to support the calculated data. The diverse numbers of stabilized states due to different P1 lengths were supposed to reflect in the inhibitory activity of a set of ligands. The in vitro testing of derivatives of proteasome inhibitor **1** with iteratively enlarged P1 residues (**2-4**; Figure 1a) allowed a correlation between the size of a residue in the S1 pocket and the resulting inhibitory activity. The length of the respective P1 residue has a direct influence on the dihedral angle α of Met⁴⁵, as shown in Scheme 1 b.

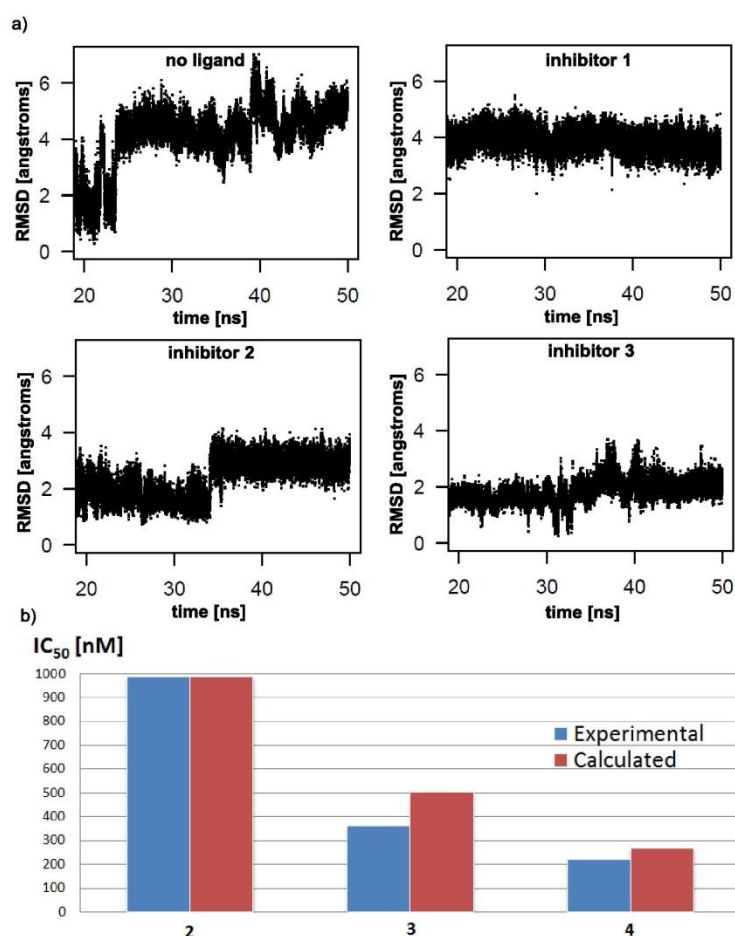


Figure 2: a) Molecular dynamics simulation of the $\beta 5$ subunit with bound inhibitors 1-3 and without any ligand. The RMSD of the Met⁶⁵ sidechain atoms relative to the starting frame is plotted over time. Calculations were done in VMD 1.9.1 and results were plotted in R.^[11] b) Comparison of experimental and calculated IC_{50} values of the inhibitors 2-4. Each experiment was performed as triplicates in two independent measurements ($n=6$). For the in silico calculation the lowest energy conformations were obtained on the basis of the crystal structure of 1 in complex with yeast 20S proteasome. The P1 residue of each inhibitor was adapted and energy minimized to a gradient of 0.01 kcal/mol. The scores (scoring function: London dG) represent relative free energies of ligand binding (ΔG_{rel}) and were converted to relative equilibrium constants by $K_{rel} = \exp(-\Delta G_{rel}/RT)$. Inverse K_{rel} were normalized to fit the dimension of experimental IC_{50} values. See supporting informations for details.

The experimental determination of $\beta 5$ -specific IC_{50} values revealed an erratic increase of the inhibitory activity from P1 = methyl to P1 = ethyl (Figure 2b, experimental). To exclude that this finding had a pure thermodynamic origin due to hydrophobic interactions of the growing P1 residue with the active site, we calculated relative Gibbs' free energies of binding in silico (Figure 2b, calculated). An antiproportionality of calculated IC_{50} values with the size of the inhibitor's P1 residue was observed, which is consistent with the assumption that additional methylene units contribute equally to the free energy of a ligand binding process. In

conclusion, the erratic decrease of IC_{50} values coming along with an enlargement of the respective P1 residue from methyl to ethyl confirmed the molecular dynamics simulation. This was our first experimental allusion to the proposed kinetic activation, since it could not be explained by thermodynamic considerations of affinity only.

The next logical step was to switch from inhibition to substrate cleavage for a detailed kinetic study. Therefore, we used a substrate-based approach to identify the minimal P1 length required to induce the kinetic activation. We synthesized fluorogenic 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) substrates (**5-7**; Figure 1c), based on the original structure of **1** with iteratively elongated P1 residues. Experimental determination of the Michaelis constant K_M , the turnover rate k_{cat} , the maximum reaction velocity V_{max} and the specificity constant (k_{cat}/K_M) should quantify the impact of a substrate-induced widening of the dihedral angle α of Met⁴⁵ on the $\beta 5$ -activity. To determine the kinetic properties of **5-7** and the widely used reference substrate for the ChT-like activity Suc-LLVY-AMC **SX**, we fluorometrically determined the respective initial velocities of the substrate cleavage in dependency of the substrate concentration and evaluated the data via the well-established Lineweaver-Burke plot (Figure 3). K_M can be interpreted as the dissociation constant of the enzyme/substrate complex, if the formation and dissociation step is much faster than product forming, and thus measures the affinity of a substrate to the active site.^[12] For all four substrates the observed K_M values were found in an almost similar range from 40 μ M for the propyl substrate **7** to 61 μ M for the ethyl substrate **6**. This implies that all substrates, although they have a P1 length distribution from methyl over propyl to tyrosyl, share a similar affinity for the active site without any observable correlation of the P1 length and K_M which is attributed to the flexibility of the Met⁴⁵ sidechain. This flexibility may be able to shape a perfect S1 binding pocket for a variety of hydrophobic P1 residues. According to our initial hypothesis, the kinetic activation due to hydrophobic interactions of a substrate and the Met⁴⁵ sidechain, the turnover rate (k_{cat}) and maximum reaction velocity (V_{max}) should increase with a growing P1 residue. A surprising result of the kinetic analysis was the difference in V_{max} and k_{cat} which was observed as the exact opposite of the expected trend according to the mouse trap hypothesis. Substrates **5** and **6** with small P1 residues showed a twofold higher V_{max} and k_{cat} than the substrates **7** and suc-LLVY-AMC **SX** with spacious P1 sidechains. This opposite trend is also clearly demonstrated by the decrease of the specificity constant k_{cat}/K_M .

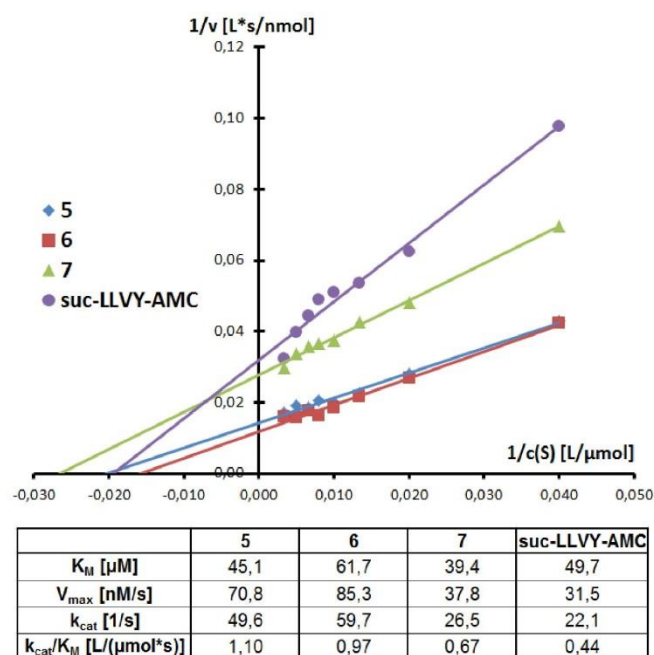


Figure 3: Double reciprocal Lineweaver-Burke plot of substrates **5-7** and suc-LLVY-AMC **SX**. Each experiment was performed as quintuples in two independent measurements ($n=10$). See supplementary materials for experimental and calculation details.

This widely used robust descriptor identifies the best substrate for a given enzyme, in other words, it ranks the specificity of an enzyme for a set of substrates.^[13] This finding is in sharp contrast to the experimentally determined IC_{50} values of respective aldehyde inhibitors **2-4** (Figure 2b, experimental), the previous knowledge derived from countless inhibitor analyses and to the initial mouse trap hypothesis. Substrates with spacious hydrophobic or aromatic P1 residues were thought to be much better substrates than the methyl substrate **5**. The actually observed “small neutral amino acid preferring” (SNAAP) or elastase-like (E-like) activity of the 20S proteasome was first reported by Orlowski et al. in 1993 but at that time referred to an additional and unidentified active subunit.^[14] Despite a report that the $\beta 7$ subunit might be responsible for the SNAAP activity, which was not experimentally proven and suggested from structural data of the bovine 20S proteasome only, it was shown by mutational studies that any observed substrate cleavage is realized by the $\beta 1$, $\beta 2$ or $\beta 5$ subunits.^[15] In these studies, the identification of the SNAAP-responsible active site was not definite since it seemed to depend on the substrate sequence around a potential cleavage site and thus was referred to all three active subunits. The very recently published X-Ray structure of the murine immunoproteasome permits a new explanation why the $\beta 5$ subunit is responsible for

this E-like activity. In immunoproteasomes the $\beta 5$ subunit ($\beta 5i$) shows a structural different S1 pocket compared to its constitutive counterpart ($\beta 5c$).^[16] Whereas in $\beta 5c$ the Met⁴⁵ sidechain is flexible and pointing into the substrate binding channel, it is oriented towards Gln⁵³ due to strong van der Waals interactions in $\beta 5i$. In $\beta 5c$ this Gln⁵³ residue is replaced by serine, which cannot stabilize this orientation of Met⁴⁵ and thus leads to a much smaller S1 binding pocket. Taking all these preliminary studies and the experimental data obtained in this work into account, we conclude that the $\beta 5$ subunit of the constitutive 20S proteasome exerts a SNAAP or E-like rather than a ChT-like activity and should be reclassified. Because of the Met⁴⁵ flexibility substrates with spacious P1 residues are able to reach the active site but their hydrolysis is disfavored compared to substrates bearing a small hydrophobic sidechain on this position. This discrimination maybe due to major structural changes of the protein backbone that are necessary to enlarge the S1 pocket.^[17] Substrate hydrolysis requires fast and dynamic structural changes, as the initial state has to be restored after every cleavage event. This induced fit may be uncritical or even beneficial for inhibiting the $\beta 5$ active site in an irreversible or slowly reversible manner but hinders substrate cleavage. This explains the experimental finding that inhibitors with iteratively enlarged P1 residues show increased inhibitory activities whereas the hydrolytic cleavage of respective substrates with identical peptidic backbones diminishes.

Additionally the examination of the Lineweaver-Burke plots (Figure 3) also brought our attention to a slight deviation from a strict linear dependency for the propyl substrate **7** and more intense for the reference substrate suc-LLVY-AMC **SX**. One feasible explanation for this anomaly is the participation of at least one additional active site to contribute to the substrate cleavage, each showing different values for K_M , k_{cat} or V_{max} . As yeast cell lines lacking the $\beta 1$ and $\beta 2$ active sites of the 20S proteasome were not viable, we had to address the presumed “leakage” for **7** and suc-LLVY-AMC **SX** by other means.

In a first experiment, aldehyde inhibitors (**2-4**; Figure 1a) showed no significant inhibitory activity against any other active site than $\beta 5$ (see supplement). In a subsequent analysis 20S proteasome was preincubated with a high concentration (500 nM) of inhibitor **1** to selectively silence the $\beta 5$ subunit. The hydrolytic activity dropped dramatically for **5** (0.5%) and **6** (0.4%), indicating that these substrates are exclusively cleaved by the $\beta 5$ subunit. Substrate **7** showed a slightly higher remaining hydrolytic cleavage after the $\beta 5$ knockout of 1.2% which may be the reason for the observed deviation from a strict linear Lineweaver-Burke plot. Surprisingly the reference substrate suc-LLVY-AMC **SX**, which is widely used in the

majority of ChT-like activity assays, showed a remaining activity of 12% under the same conditions. This is consistent with the obvious non-linear behaviour of the Lineweaver-Burke plot. Unselective cleavage of the established reference substrate may be critical when suc-LLVY-AMC **SX** is used to rank the selectivity and potency of inhibitors for the ChT-like activity. For this reason substrate **5**, Z-Leu-Asp(OtBu)-Ala-AMC, is preferable for these applications and the substitution of suc-LLVY-AMC **SX** is recommended.

Literaturverzeichnis:

- [1] A. Hershko, E. Leshinsky, D. Ganoth, H. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81*, 1619-1623.
- [2] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687-717.
- [3] a) J. Driscoll, M. G. Brown, D. Finley, J. J. Monaco, *Nature* **1993**, *365*, 262-264; b) P. M. Voorhees, E. C. Dees, B. O'Neil, R. Z. Orlowski, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 6316-6325.
- [4] a) K. M. Kortuem, A. K. Stewart, *Blood* **2013**, *121*, 893-897; b) R. C. Kane, A. T. Farrell, R. Sridhara, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2955-2960.
- [5] S. Meiners, A. Ludwig, V. Stangl, K. Stangl, *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 309-327.
- [6] H. A. Braun, S. Umbreen, M. Groll, U. Kuckelkorn, I. Mlynarczuk, M. E. Wigand, I. Drung, P.-M. Kloetzel, B. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28394-28401.
- [7] J. Sterz, C. Jakob, U. Kuckelkorn, U. Heider, M. Mieth, L. Kleeberg, M. Kaiser, P.-M. Kloetzel, O. Sezer, I. von Metzler, *Eur. J. Haematol.* **2010**, *85*, 99-107.
- [8] E. J. A. M. Sijts, P. M. Kloetzel, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 1491-1502.
- [9] a) F. Luciani, C. Kesmir, M. Mishto, M. Or-Guil, R. J. De Boer, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2422-2432; b) M. Mishto, F. Luciani, H.-G. Holzhütter, E. Bellavista, A. Santoro, K. Textoris-Taube, C. Franceschi, P. M. Kloetzel, A. Zaikin, *J. Mol. Biol.* **2008**, *377*, 1607-1617; c) A. K. Nussbaum, C. Kuttler, K.-P. Haderler, H.-G. Rammensee, H. Schild, *Immunogenetics* **2001**, *53*, 87-94; d) C. Kesmir, A. K. Nussbaum, H. Schild, V. Detours, S. Brunak, *Protein Eng.* **2002**, *15*, 287-296.
- [10] M. Groll, C. R. Berkens, H. L. Ploegh, H. Ovaa, *Structure* **2006**, *14*, 451-456.
- [11] a) *R Core Team. R: A language and environment for statistical computing.*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., **2013**; b) W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33-38.
- [12] W. W. Chen, M. Niepel, P. K. Sorger, *Genes Dev.* **2010**, *24*, 1861-1875.
- [13] R. Eisinger, M. J. Danson, D. W. Hough, *Trends in Biotechnology* **2007**, *25*, 247-249.
- [14] M. Orlowski, C. Cardozo, C. Michaud, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1563-1572.
- [15] a) M. Unno, T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka, T. Tsukihara, *Structure* **2002**, *10*, 609-618; b) T. P. Dick, A. K. Nussbaum, M. Deeg, W. Heinemeyer, M. Groll, M. Schirle, W. Keilholz, S. Stevanović, D. H. Wolf, R. Huber, H.-G. Rammensee, H. Schild, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25637-25646.
- [16] Eva M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, Christopher J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, *148*, 727-738.
- [17] E. M. Huber, M. Groll, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 8708-8720.

3.4 Maßgeschneiderte *in vivo*-Assays am Zebrafisch-Embryonen-Modell

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung krankheitsspezifischer *in vivo*-Assays am Zebrafisch-Embryonen-Modell. Diese Assays ermöglichen gewünschte bzw. unerwünschte Effekte eines potentiellen Wirkstoffs, direkt nach dessen Synthese, am lebenden Organismus zu verfolgen. Die Ermittlung der toxikologisch unbedenklichen Wirkstoffkonzentrations-Obergrenze ist durch den sog. DarT gegeben. Die Entwicklung der Zebrafischlarven wird hierbei in unterschiedlich konzentrierten, wässrigen Wirkstofflösungen verfolgt und Phänotypen abnormer Entwicklung dokumentiert und analysiert. Die toxikologische Kennzahl LC_{50} oder das biologische Wirkkriterium EC_{50} werden durch ein solches Vorgehen zugänglich. Zudem wurden durchaus spezialisiertere Assays entwickelt. Die Inhibition der Kinase GSK-3 ist ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung der Alzheimer Demenz. Diese Inhibition während der embryonalen Entwicklung des Zebrafischs führt zum charakteristischen Phänotyp einer Rückgratverkrümmung, die in diesem Falle die Wirksamkeit des Inhibitors *in vivo* belegt. Die Verteilung von Fluoreszenzfarbstoffen im Organismus kann am Fluoreszenzmikroskop bis hin zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke in Echtzeit verfolgt werden. Fokus der Arbeit lag in der Entwicklung maßgeschneiderter Assays zur Testung der zuvor synthetisierten Proteasominhibitoren. Wie in der Einleitung erläutert, hat die Inhibition des Proteasoms nicht nur Einfluss auf die Proliferation von Krebszellen, sondern beeinträchtigt zudem biochemische Reparaturmechanismen nach strahleninduzierter Schädigung der DNA und besitzt deshalb Potential zur Sensitivierung von Tumoren im Zuge der Strahlentherapie. Eins der entwickelten Assays ermöglicht durch Vergleich mit etablierten positiven Kontrollen die Identifikation solcher Strahlensensitiva. Zudem ist die Testung Strahlungs-schützender Substanzen, sog. Radioprotektiva, möglich, die dem Schaden durch Strahlung risikobehafteter Gruppen vorbeugen können. Diese Substanzen wirken i.d.R. antioxidativ durch Reduzierung des strahleninduzierten ROS/RNS-Überschusses oder durch direkte Aktivierung DNA-Reparatur-unterstützender Proteine. Ein weiteres Assay steht im Kontext der frühzeitigen Erkennung nervenschädigender Wirkung neuartiger Proteasominhibitoren. Das Auftreten von *Peripherer Neuropathie* an behandelten Krebspatienten ist die wesentliche Schwachstelle der zugelassenen Proteasominhibitoren. Inhibitoren der nächsten Generation sollen ohne diese Nebenwirkung auskommen. Der bereits im Embryonalstadium ausgebildete Fluchreflex der Zebrafischlarven wird dabei als Maßstab für Neurotoxizität genutzt. Die Reaktion der Larve wird nach einem äußeren Reiz mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet. Eine

speziell entwickelte Software analysiert zeitaufgelöst die Änderung des Winkels der Körperbiegung. Führt eine, laut DarT untoxische, Konzentration des Wirkstoffs zu Unregelmäßigkeiten des Fluchtreflexes, so wird diese Verbindung aussortiert.

Die Entwicklung maßgeschneiderter Assays am Zebrafisch-Embryo liefert tierschutzkonforme Alternativen zu Säugetierversuchen und macht wertvolle biologische Daten am lebenden Organismus zugänglich, sodass am Prozess der Wirkstoffentwicklung eine enorme Ersparnis an Zeit und Geld gewährleistet wird.

Beitrag C. Voss: Aufbau und Wartung des Chemielabor-internen biologischen Bereichs, Fluoreszenzmikroskopie, DarT-Assay, Strahlen-Assay, Fluchtreflex-Assay.

Detaillierte Beschreibung der Tierhaltung, der Tierzucht und der Durchführung sämtlicher Assays sind im Methodenteil zu finden.

medizinalchemie

Chemieforschung in Darmstadt



38

labor&more 5.13

Die Wahl der Besten

Maßgeschneiderte In-vivo-Assays als tierschutzkonforme Alternative
in der Wirkstoffentwicklung

Prof. Dr. Boris Schmidt und Constantin Voss
Clemens-Schöpf-Institut für
Organische Chemie und Biochemie,
Technische Universität Darmstadt

Die chemische Industrie gilt traditionell als Großverschmutzer und Katastrophenverursacher. Um diesem schlechten Ruf entgegenzuwirken und immer strenger werdende gesetzliche Vorlagen zu erfüllen, werden seit nun mehr als zwei Jahrzehnten enorme Bemühungen in den Ausbau der „Grünen Chemie“ investiert. Dabei gelten bis heute folgende Prinzipien als Fundament einer nachhaltigen chemischen Produktion: Abfallvermeidung statt -entsorgung, Ressourcen wie Erdöl und Wasser schonen, erneuerbare Rohstoffe bevorzugen, gefährliche Chemikalien ersetzen und Großanlagen sicher betreiben. Auch wenn dieses Öko-Image der Industrie vor allem in den Köpfen der Bevölkerung nicht immer aufgeht, bleiben dennoch einige Fakten positiv hervorzuheben: Die Zahl an Chemieunglücken hat sich stark verringert, der Regen in Deutschland ist aufgrund besserer Schwefeldioxidfilter weniger sauer und das Wasser aus Flüssen wie Donau, Rhein und Oder fließt sauberer.



Constantin Voss, geb. 1985, studierte Chemie an der Technischen Universität Darmstadt mit dem Abschluss Diplom-Ingenieur. Seine Diplomarbeit mit dem Titel „Synthese von funktionalisierten Distyrylpyridazinen für die Fluoreszenzdiagnostik“ fertigte er 2011 im Arbeitskreis Prof. Boris Schmidt an. Diese Arbeit wurde durch die Darmstädter Stiftung für Technologietransfer mit einem Preis ausgezeichnet. Seit der Aufnahme als Stipendiat im DFG-geförderten Graduiertenkolleg 1657 „Molekulare und zelluläre Reaktionen auf ionisierende Strahlung“ promoviert er unter der Betreuung von Boris Schmidt am Clemens-Schöpf-Institut der TU Darmstadt.

Boris Schmidt, geb. 1962, studierte Chemie an der Universität Hannover und am Imperial College in London. Nach seiner Promotion 1991 an der Universität Hannover lehrte er bis 1994 am Uppsala Biomedical Centre und forschte zwischenzeitlich als DFG-Stipendiat im Rahmen eines Post-Doc-Aufenthalts am Scripps Institute in La Jolla in der Gruppe um Prof. K. B. Sharpless. Zurück an der Universität Hannover, habilitierte Boris Schmidt und sammelte im Anschluss Industrieerfahrung bei Novartis in Basel, bis er 2002 dem Ruf auf eine C3-Professur an der TU-Darmstadt folgte. Neben zahlreichen Auszeichnungen und Stipendien wurde ihm jüngst der Alzheimer-Forschungspreis der Hans und Ilse Breuer-Stiftung zusammen mit Prof. T. Misgeld verliehen.

Foto: Christoph Scholz

Verantwortung gegenüber Mensch und Tier

Was in der chemischen Produktion von Massenchemikalien die Verantwortung für Mensch und Umwelt bedeutet, ist im pharmazeutischen Industriezweig der Chemie gleichbedeutend mit der Verantwortung gegenüber Mensch und Tier. Die In-vitro-Technik gilt als Domäne der Biologie, die es sich zur Aufgabe gemacht hat, der Wirkstoffaktivität und -toxizität an Zellen und Geweben tierischer und pflanzlicher Herkunft nachzugehen. Die gewonnenen Erkenntnisse werden dann bestmöglich auf den Menschen übertragen. Diese Methodik ist sowohl in den großen Pharmaunternehmen als auch in der Lehre an Universitäten fest verankert und gilt als Meilenstein in der Reduzierung von Säugetierversuchen. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe, deren

Synthese und Charakterisierung bleibt allerdings zentrale Aufgabe der Chemie, im Speziellen der Medizinalchemie. Das übliche Vorgehen eines Medizinalchemikers liegt dabei in der Erkennung biochemischer Mechanismen, die für ein bestimmtes Krankheitsbild charakteristisch wirken bzw. eine Wirkung induzieren. Wurde eine solche Zielstruktur identifiziert, was beispielsweise ein spezielles Enzym sein kann, so wird dieses durch charakteristische Wechselwirkungen mit Wirkstoffkandidaten beeinflusst, um den erwünschten Effekt auszulösen. Die „besten“ Kandidaten durchlaufen dann im Rahmen präklinischer Studien geeignete Tierversuche, um anschließend die klinischen Testphasen zu erreichen. Besteht ein Wirkstoff sämtliche Phasen und Prüfungen, so steht auf dem Weg zum Medikament nur noch die Zulassung. Was sich hier

wie eine Kausalkette anhört, ist tatsächlich ein mühseliger und langer Prozess, der immer enorme Kosten bis zur Registrierung und Markteinführung eines Wirkstoffes verursacht.

Die Rolle der Chemie in der Wirkstoffentwicklung

Bei der schematischen Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Wirksamkeitsbewertung (Abb. 1) ist der Chemiker auf der ersten Säule anzusiedeln und stellt nach verrichteter Arbeit eine Vielzahl an potenziell geeigneten Wirkstoffkandidaten bereit. Auf diesem noch relativ niedrigen Wissensstand werden diese Kandidaten traditionell aus den Händen der Chemie an die Biologie und Medizin weitergereicht. Nun entscheiden pharmakokinetische und toxikologische Studien,

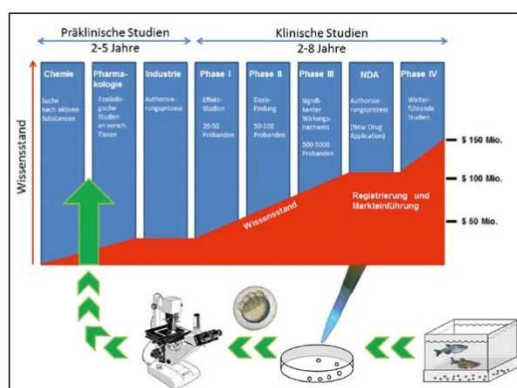


Abb. 1 Verlauf der Wirkstoffentwicklung von Laborsynthese bis Markteinführung (oben) und die schematische Einordnung des neuen Forschungsschwerpunkts von Prof. Boris Schmidt in das Gesamtkonzept (unten).

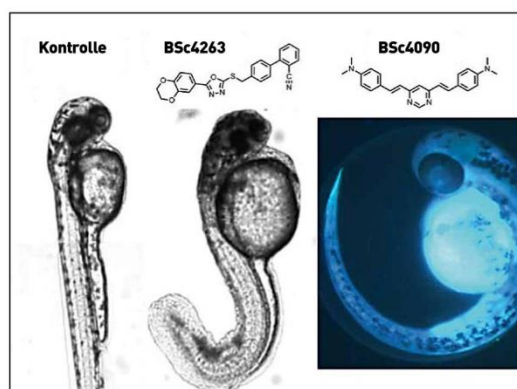


Abb. 2 Normal entwickelte, dechorionierte Zebrafischlarve (2 Tage alt) (links). Fehlbildete, dechorionierte Zebrafischlarve (2 Tage alt). Die Inhibition von GSK-3 durch BSc4263 (2,5µM) führt zu charakteristischen Phänotypen (mitte) [2]. Eingefärbte Zebrafischlarve im Chorion (2 Tage alt) (rechts). Verteilung und Anreicherung des Fluorophors BSc4090 (3µM) lässt sich am Fluoreszenzmikroskop verfolgen [3].

welche Verbindungen sich besonders eignen. Sofern möglich, erfolgt diese Selektion durch zelluläre In-vitro-Assays. Viele Fragestellungen können jedoch trotz aller Fortschritte der In-vitro-Technik erst im Gesamtorganismus beantwortet werden. Aufgrund der Nähe zum Menschen kommen dazu typischerweise Säugetiere zum Einsatz, im Speziellen Mäuse, Ratten und Kaninchen zum Einsatz.

Die vollständige Verdrängung von Versuchen an Säugetieren im Zuge der Wirkstoffentwicklung wird in naher Zukunft kaum möglich sein. Motivation eines jeden Gliedes der Entwicklungsmaschinerie sollte dennoch die Reduzierung der für die Tiere oftmals qualvollen Praktiken durch den Ersatz durch tierschutzkonforme In-vivo-Systeme sein.

Frühe Testung der Wirkstoffkandidaten

Eine Literaturrecherche zu derartigen Assays führt schnell zum Zebrafischembryonenmodell. Aufgrund der neuen europäischen REACH-Bestimmungen, welche die Testung unzähliger Altchemikalien vorschreibt, erfährt der so genannte Fischembryontoxizitätstest (FET) eine Art Renaissance. Im FET werden toxikolo-

medizinalchemie

Chemieforschung in Darmstadt

gische Daten anhand spezifischer Phänotypen am Zebrafischembryo erfasst, was sich bereits in automatisierten Screeningverfahren bewährt hat und 2007 vom Deutschen Institut für Normung als Methodik für Risikobewertung von Chemikalien in der Ökotoxikologie aufgenommen wurde (DIN 38 415-6, ISO 15088) [1].

In einem medizinalchemisch ausgerichteten Arbeitskreis werden stetig neue potenzielle Wirkstoffe produziert, die verschiedenste Wege in die Testung finden. Dies führt mittlerweile zu großen Verzögerungen und hohem Kostenaufwand und wird deshalb nicht selten zum Nadelöhr der Wirkstoffentwicklung. Die Möglichkeit, erste biologische Daten zur Aussortierung ungeeigneter Derivate im eigenen Labor erheben zu können, führt zu effizienteren Arbeiten und macht eine Vielzahl an weiterführenden externen Testungen hinfällig. Das Vorgehen, das nun seit bereits drei Jahren im AK Prof. Boris Schmidt verfolgt wird, knüpft am FET an, konzentriert sich allerdings auf die Entwicklung krankheitsspezifischer In-vivo-Assays an Zebrafischembryonen. Dies macht es möglich, einen gewünschten bzw. unerwünschten Effekt eines potenziellen Wirkstoffs direkt nach dessen Synthese im eigenen Labor zu verfolgen.

Im Falle neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer kann dies neben der rein toxikologischen Evaluation der Wirkstoffe zusätzlich der Wirknachweis durch spezifische Phänotypen früher Ent-

wicklungsstadien des Fisches sein. So führt beispielsweise die Inhibition der im Entstehungsprozess der Alzheimer-Demenz beteiligten Kinase GSK-3 in der Zebrafischlarve zu Entwicklungsstörungen, die unter dem Mikroskop anhand charakteristischer Rückgratverkrümmung bereits in einem Alter von zwei Tagen nachzuweisen sind (Abb. 2) [2]. Auch Fluoreszenzfarbstoffe, die zur selektiven Färbung der im Verlauf der Krankheit entstehenden Proteinablagerungen Tau und A β entwickelt werden, benötigen einen maßgeschneiderten Assay. Denn die Hürde, die ein solcher Farbstoff überwinden muss, um den Ort der Ablagerungen, das Gehirn, zu erreichen, ist die Blut-Hirn-Schranke (BBB) [3]. Obgleich bei einem Zebrafischembryo wohl kaum eine Alzheimer-Demenz zu erwarten ist, lässt sich dennoch der Transport des Fluorophors durch die Blutgefäße bis zum Gehirn beeindruckend am Fluoreszenzmikroskop verfolgen. Erst wenn ein solches Experiment positiv verläuft, erfolgt die weitere Testung an Säugetieren bis hin zur Entwicklung eines BBB-permeablen Wirkstoffs.

Radiosensibilisatoren für die Strahlentherapie

Ein weiterer Schwerpunkt des Arbeitskreises besteht in der Entwicklung und Evaluation von Radiosensibilisatoren. Dabei handelt es sich um Substanzen, die Tumore empfindlicher für ionisierende Strahlung machen mit der Absicht, in der Radiotherapie

niedrigere Strahlendosen zu ermöglichen. Umliegendes, gesundes Gewebe nimmt dann weniger Schaden. Die übliche Vorgehensweise der Forschungsinstitute und pharmazeutischen Industrie ist die Evaluierung der Wirkstoffdosis in Kombination mit ionisierender Strahlung am Mausmodell. Im Rahmen des DFG-geförderten Graduiertenkollegs 1657 konnte jüngst ein In-vivo-Assay aufgebaut werden, das den synergistischen Effekt aus Röntgenstrahlung und Wirkstoff leicht zugänglich macht. Es wird kaum überraschen, dass unsere Wahl auch hier auf die Zebrafischlarve fiel. Nachdem die Eier ein Tag alt sind, erfolgt die Vergabe des Wirkstoffs in verschiedenen Konzentrationen und die Bestrahlung mit der hohen Dosis von 20 Gy. An den darauffolgenden Tagen wird das Überleben bestrahlter und nichtbestrahlter Embryonen verfolgt und am fünften Tag abgebrochen. Die erhaltenen Überlebenskurven erlauben neben der Identifikation radiosensibilisierender Wirkung auch eine Abschätzung der Toxizität (Abb. 3).

Neue Proteasominhibitoren im Fokus

Neben der Fähigkeit, Zellen empfänglicher für ionisierende Strahlung zu machen, stehen Inhibitoren des 26S-Proteasoms als Initiatoren des programmierten Zelltods seit über 20 Jahren im Fokus der Krebsforschung. Diese Substanzklasse ermöglicht durch Ein-

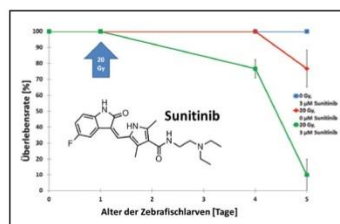


Abb.3 Synergistischer Effekt aus ionisierender Strahlung und Wirkstoff, exemplarisch am Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib [4]. Der Wirkstoff ist in 3- μ M-Konzentration nicht toxisch (blaue Linie). Röntgenbestrahlung führt zum Sterben der Larven ab dem vierten Tag (rote Linie). Im Vergleich dazu hat die Kombination aus Sunitinib und ionisierender Strahlung eine signifikante Erhöhung der Toxizität zur Folge (grüne Linie). Wirkstoffzugabe und Bestrahlung erfolgt am ersten Tag. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus Triplikat-Experimenten mit jeweils 10 Zebrafischeiern abgebildet.

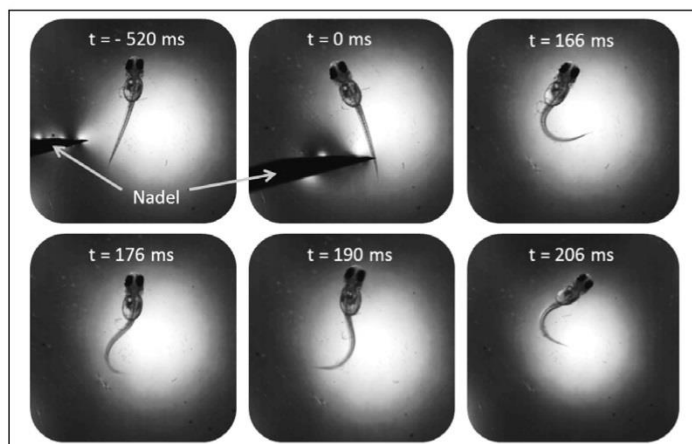


Abb.4 Fluchtreflex einer gesunden, zwei Tage alten Larve, ausgelöst durch äußeren Nadelreiz (Zeitpunkt $t = 0$ ms). Die Bilderfolge zeigt einen Schwanzschlag in einem Zeitintervall von 206 ms.

griff in den zellulären Stoffwechsel das Sterben der schnell wachsenden Krebszellen mit weitgehender Verschonung gesunder Zellen. Zwei Proteasominhibitoren (Bortezomib und Carfilzomib) sind bereits durch die FDA als Chemotherapeutika zur Behandlung des multiplen Myeloms und des Mantelzelllymphoms zugelassen [5]. Beide Wirkstoffe lösen aufgrund mangelnder Selektivität als Nebenwirkung die schwere Nervenerkrankung „periphere Neuropathie“ aus [6]. Neu entwickelte Proteasominhibitoren aus unserem Arbeitskreis sollen ohne diese Nebenwirkung auskommen. Üblicherweise wird die Penetration des Gehirns nach Injektion der Wirkstoffe in Mäusen und Ratten ermittelt. Unser Vorgehen nutzt den bereits im Embryonalstadium ausgebildeten Fluchtreflex des Zebrafischembryos als Maßstab für Neurotoxizität. Nach einem äußeren Reiz wird die Reaktion einer dechorionierten Larve mit einer Hochgeschwindigkeitsdigitalkamera (500 Bilder pro Sekunde) aufgezeichnet (Abb. 4). Spezielle Software misst den Winkel der Körperbiegung bzw. den Winkel der Auslenkung des Schwanzes. Diese Messdaten ermöglichen die Quantifizierung sensorischer Innervierung der Larve und erlauben den direkten Vergleich mit den zugelassenen Medikamenten als Referenzsubstanzen.

Mit dem neuen Forschungsschwerpunkt Assay-Entwicklung im Arbeitskreis Boris Schmidt werden tierschutzkonforme Alternativen zu Säugetierversuchen entwickelt und ausgebaut, zusätzlich wertvolle biologische Daten erhoben, die zur frühzeitigen Trennung der Spreu vom Weizen der Wirkstoffentwicklung führen.

→ schmidt_boris@t-online.de
 → voss.constantin@googlemail.com

Literatur

- [1] a) Lammer, E. et al. (2009), *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 149, 196–209; b) Strähle, U. et al. (2011), *Reprod. Toxicol.*, In Press, Corrected Proof; c) Alshut, R. et al. (2011), *at - Automatisierungstechnik*, 59, 259–268
- [2] Monte, F. Loet al. (2012), *J. Med. Chem.*, 55, 4407–4424
- [3] Kieser, D., *Dissertation thesis* (2011), Technische Universität Darmstadt (Darmstadt)
- [4] Cuneo, K. C. et al. (2008), *Int. J. Radiat. Oncol.* 71, 873–879
- [5] a) Borissenko, L. & Groll, M. (2007), *Chemical Reviews* (Washington, DC, United States), 107, 687–717; b) Rentsch, A. (2013), *Angew. Chem. Int. Ed.*, n/a-n/a
- [6] Siegel, D. S. et al. (2012), *Blood*, 120, 2817–2825

Foto: dpa Picture-Alliance GmbH

Abbildung 1: Constantin Voss

Quelle: <http://www.linnaeus.uu.se/online/pharm/lakemedelutveckling.html>

Zebrafischb: mikbailg

- Fotolia.com

3.5 Synthese und histologische Evaluation niedermolekularer Fluoreszenzsonden

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits veröffentlicht:

Alexander Boländer, Daniel Kieser, Constantin Voss, Silvia Bauer, Christian Schön, Steffen Burgold, Tobias Bittner, Jana Hölzer, Roland Heyny-von Haußen, Gerhard Mall, Valérie Goetschy, Christian Czech, Henner Knust, Robert Berger, Jochen Herms, Ingrid Hilger, Boris Schmidt, “*Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines and -pyridazines as Imaging Agents for Tau Fibrils and β -Amyloid Plaques in Alzheimer’s Disease Models*“, Journal of Medicinal Chemistry **2012**, 55, 9170-9180.

Mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

Dieses Kapitel beschreibt die Synthese und histologische Evaluation niedermolekularer Fluoreszenzsonden an verschiedenen Modellen der Alzheimer Demenz. Es wurden Synthesemethoden entwickelt, die ein breites Spektrum an struktureller Variabilität durch Derivatsynthesen bieten. Im Mittelpunkt der Arbeit steht die Synthese von Bis-arylvinyl-pyrazinen, -pyrimidinen und -pyridazinen. Letztere Substanzklasse steht im chemischen Fokus, da die optimierte, zehnstufige Syntheseroute eine Derivatisierung sowohl an den beiden Flanken des π -Systems, als auch am heteroaromatischen Kern der Struktur zugänglich macht. Die strukturelle Motivation dieser Fluorophore lässt sich auf Curcumin **1** und den etablierten Fluoreszenzmarker Me-XO4 **5** zurückführen. Affinität gegenüber Tau-Fibrillen und amyloiden Plaques wurde durch histochemische Färbung an menschlichem Hirngewebe und im Rahmen eines Verdrängungs-Assays *in vitro* getestet. Anhand der biologischen Daten wurde eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufgestellt, die den Tau-selektiven Marker BSc4090 **7a** identifizierte, dessen Hirngängigkeit *in vivo* im transgenen Mausmodell mit kranialem Fenster anhand Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung nachgewiesen wurde. Zudem konnte durch histochemische Untersuchungen an Bowman-Drüsen der Riechschleimhaut von Alzheimer Demenz Patienten eine neue Methode zur Frühdiagnostik der Krankheit vorgestellt werden.

Ferner wurde Me-XO4 **5** durch H₂O₂-sensitive Boronester-Gruppen derivatisiert und auf dessen Eignung als ROS-Sonde im Kontext des metabolischen Imagings getestet. Zwar war eine gewisse Affinität gegenüber Mitochondrien nachweisbar, allerdings scheiterte dieser Ansatz an zu ähnlichen Absorptions-/Emissions-Wellenlängen der Boronester-Derivatisierung und des freien Biphenols Me-XO4 **5**. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz nicht publiziert und wird in Zukunft auf Basis des Fluorophors BSc4090 **7a** verfolgt.

Beitrag C. Voss: Synthese von **12**, **14a-c**, **15a-c**, **16a-c**, **17a-c** und **8a-e**, histochemische Färbung an menschlichem Hirngewebe mit **8a-e** (Nummern wie in Publikation).

Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines, and -pyridazines As Imaging Agents for Tau Fibrils and β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Models

Alexander Boländer,[†] Daniel Kieser,[†] Constantin Voss,[†] Silvia Bauer,[†] Christian Schön,[‡] Steffen Burgold,[‡] Tobias Bittner,[‡] Jana Hölzer,[§] Roland Heyny-von Haußen,^{||} Gerhard Mall,^{||} Valérie Goetschy,[⊥] Christian Czech,[†] Henner Knust,[⊥] Robert Berger,[†] Jochen Herms,[‡] Ingrid Hilger,[§] and Boris Schmidt^{*,†}

[†]Clemens Schoepf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt, Germany

[‡]DZNE site Munich and Center of Neuropathology, Ludwig-Maximilians-Universität, 81377 Munich, Germany

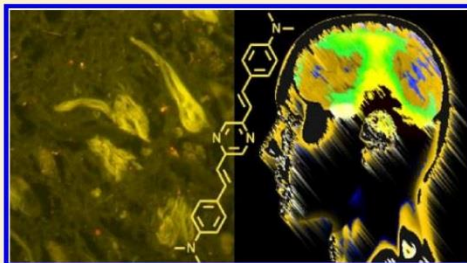
[§]Institute of Diagnostic and Interventional Radiology I, Experimental Radiology, Universitätsklinikum Jena, 07747 Jena, Germany

^{||}Department of Pathology, Klinikum Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany

[⊥]F. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basel, Switzerland

Supporting Information

ABSTRACT: The in vivo diagnosis of Alzheimer's disease (AD) is of high socioeconomic interest and remains a demanding field of research. The biopathological hallmarks of the disease are extracellular plaques consisting of aggregated β -amyloid peptides ($A\beta$) and tau protein derived intracellular tangles. Here we report the synthesis and evaluation of fluorescent pyrazine, pyrimidine, and pyridazine derivatives in vitro and in vivo aiming at a tau-based diagnosis of AD. The probes were pre-evaluated on human brain tissue by fluorescence microscopy and were found to label all known disease-related alterations at high contrast and specificity. To quantify the binding affinity, a new thiazine red displacement assay was developed and selected candidates were toxicologically profiled. The application in transgenic mouse models demonstrated bioavailability and brain permeability for one compound. In the course of histological testing, we discovered an AD-related deposition of tau aggregates in the Bowman's glands of the olfactory epithelium, which holds potential for an endoscopic diagnosis of AD in the olfactory system.



■ INTRODUCTION

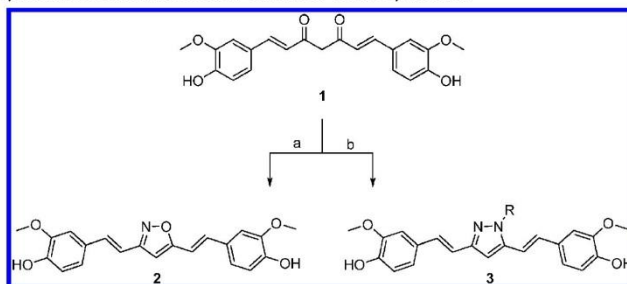
With approximately 36 million people worldwide suffering from dementia and with that number expected to grow to 114 million by 2050, AD is the most common type of dementia among older adults.¹ There is no cure for the disease, and a distinct diagnosis can be carried out by postmortem examination only, when the biopathological hallmarks of AD are detectable in human brain tissue. These are two notorious protein aggregates: extracellular plaques mainly consisting of two β -amyloid peptides $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ and intracellular tangles resulting from the aggregation of abnormally hyperphosphorylated tau protein to paired helical filaments. Both deposits are considered to impair intra- and interneuronal reaction cascades, causing progressive neurodegeneration almost decades before the first signs of cognitive impairment emerge.² It has been shown that the load of tau fibrils in brain tissue correlates far more accurately to the severity of dementia, whereas there are several reports for amyloid plaque burden at autopsy, yet no signs of cognitive impairment during lifetime.³ Nevertheless,

both deposits remain the most important targets for in vivo imaging of disease progression. Especially positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT) are under constant further development with respect to new radiolabeled markers to visualize the pathology. [¹¹C]PIB is the most prominent and most frequently applied PET tracer to visualize $A\beta$ in vivo.⁴

The insufficient ability of the markers to discriminate between intracellular tau and extracellular $A\beta$ and the relative amounts of these deposits limit them to $A\beta$ detection. In the course of ligand design, tau-targeting probes have emerged more slowly than $A\beta$ probes. This may be due to the still overwhelming interest in $A\beta$. Therefore tau-directed probes are needed. On the basis of histological staining of tau fibrils and

Special Issue: Alzheimer's Disease

Received: May 9, 2012

Scheme 1. Reported Synthesis of Curcumin-Derived Isoxazoles 2 and Pyrazoles 3^a

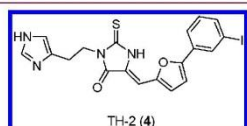
^a(a) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, pyridine, EtOH, reflux. (b) RNHNH_2 , MeOH, NEt_3 , rt/ RNHNH_2 , trifluoroacetyl (TFA), toluene, reflux.⁵

$\text{A}\beta$ plaques, we sought nontoxic fluorescent dyes of high photostability and a high affinity to tau over $\text{A}\beta$, easy to handle and applicable in biological and histological staining.

RESULTS AND DISCUSSION

We reported on curcumin-derived isoxazoles 2 and pyrazoles 3 as high-affinity ligands for fibrillar $\text{A}\beta_{42}$ aggregates and as potent inhibitors of tau aggregation recently (Scheme 1).

These results suggest a fundamental affinity of these compounds to tau deposits in vitro. The same rationale was exploited to arrive at the tau ligand TH-2 (4) (Figure 1).⁶

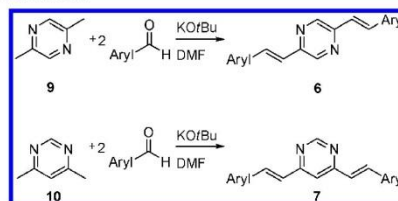
Figure 1. Structure of the tau ligand TH-2 (4).⁶

Curcumin (1) itself is currently used in optical imaging studies and led to the identification of $\text{A}\beta$ plaques in the mouse retina, yet it requires high intravenous dosage of 1, which is deemed toxic for humans.⁷ Unfortunately, the fluorescence of isoxazoles 2 and pyrazoles 3 is low, and their derivation from 1 imposes limits on the substitution pattern of their phenylenevinylene flanks. Structurally, they resemble methoxy-XO4 (5) (Figure 2), the benchmark ligand for fluorescence microscopy of $\text{A}\beta$ plaques in vivo, which has also been used for $\text{A}\beta$ -PET imaging as its ^{11}C -labeled isotopologue⁸ but displays very low clearance and nonideal single-photon excitation in tissue, ruling out a clinical application.^{8–10}

The replacement of the anisole core of 5 by pyrazine, pyrimidine, or pyridazine as aromatic cores with a high electron-withdrawing character and significant aromaticity should lead to molecules with high conjugation length and permits a large structural variability within the flanks of the molecule. This allows for an improvement of physicochemical properties by introducing functional groups affecting lipophilicity and fluorescence. Herein we describe the synthesis of bis(arylethenyl)pyrazines 6, -pyrimidines 7, and -pyridazines 8 (Figure 2) and their histological and toxicological evaluation with respect to AD pathology, aiming at an in vivo diagnosis of AD-associated protein deposits.

The styryl scaffold of 6 and 7 is formed in an atom-efficient reaction by the condensation of aromatic aldehydes and dimethylpyrazine 9 or dimethylpyrimidine 10 according to a slightly modified published procedure (Scheme 2).¹¹

Scheme 2. Synthesis of Bis(arylethenyl)pyrazines 6 and -pyrimidines 7



The selectivity was sufficiently high to generate *trans* isomers only within the limits of NMR detection by the coupling

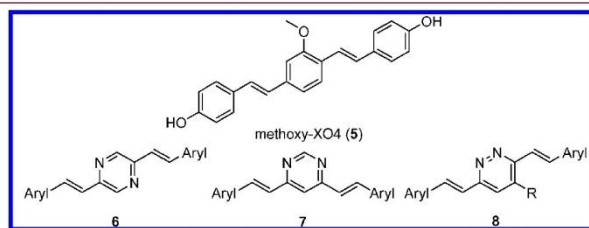


Figure 2. 5, bis(arylethenyl)pyrazines 6, -pyrimidines 7, and -pyridazines 8.

Table 1. 5 and the Synthesized Bis(arylviny)pyrazines 6a–h, -pyrimidines 7a–f, and -pyridazines 8a–e with Determined Affinities, Spectroscopical Data, and Polarizability

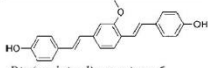
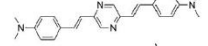
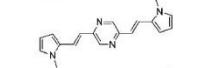
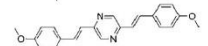
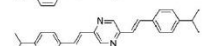
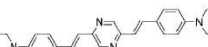
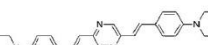
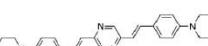
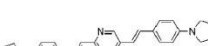
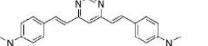
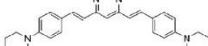
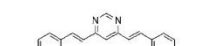
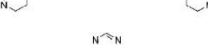

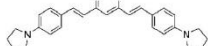
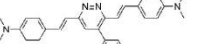
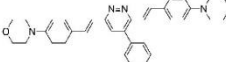
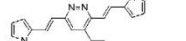
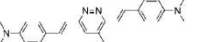
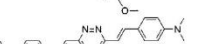
compound	IC ₅₀ (nM) ^a Tau	cLogP ^b Aβ	λ _{abs} ^{max} (nm)	λ _{abs} ^{max} (nm) (calculated) ^c	λ _{em} ^{max} (nm)	α' (a ₀) ^{3d}
5  <i>Bis(arylviny)pyrazines 6</i>	246	140	5.35			
6a 	<i>n.m.^e</i>	4.10	405	453	570	507
6b 	<i>n.m.^e</i>	1.38	435	420	544	362
6c 	13	17	3.89	380	414	421
6d 	<i>inactive</i>	6.29	375	403	457	455
6e 	6	43	2.87	380	448	560
6f 	42	51	3.12	390	454	608
6g 	<i>n.m.^e</i>	5.29	385	454	574	585
6h 	<i>n.m.^e</i>	4.66	416	458	565	568
<i>Bis(arylviny)pyrimidines 7</i>						
7a 	4	54	4.54	430	428	462
7b 	<i>inactive</i>	3.32	380	424	538	517
7c 	7469	2381	3.56	405	427	563
7d 	17	156	5.73	414	429	540
7e 	2	52	5.10	440	434	581
7f 	2	3	5.68	450	476	587

Table 1. continued

compound	IC ₅₀ (nM) ^a		cLogP ^b	λ_{abs}^{max} (nm)	λ_{abs}^{max} (nm) (calculated) ^c	λ_{em}^{max} (nm)	α' (a ₀) ^d
	Tau	Aβ					
Bis(arylvinyl)pyridazines 8							
8a		inactive	6.13	411	455	537	559
8b		4707 7591	4.91	365	448	535	614
8c		inactive	3.41	409	429	509	419
8d		1591 4571	5.96	410	453	534	580
8e		1251 10066	6.19	415	457	535	560

^aIC₅₀ values were determined in a thiazine red displacement assay as duplicates of replicate experiments.¹³ ^bCalculated cLogP values.¹⁴ ^cCalculated absorption maxima.¹³ ^dCalculated static electronic polarizability volume $\alpha' = \alpha/(4\pi\epsilon_0)$ in units of the Bohr radius cubed (a₀³), where α = calculated polarizability¹³ and ϵ_0 = vacuum permittivity.¹³ ^en.m.: not measurable due to spectral overlap with the reference compound thiazine red.

constant for the vinylic protons in the ¹H NMR spectra (*J* ca. 16 Hz). The products obtained are listed in Table 1.

The synthesis of the bis(arylvinyl)pyridazines **8** was carried out via a 10-step synthesis (Scheme 3).

Starting from glycine ethyl ester hydrochloride **11**, tetrazinedimethylcarboxylate **12** was obtained according to a strategy reported for **13a** (R = phenyl).¹² The diversity of the aromatic substituent R on the pyridazines **14a–c** was introduced by a subsequent Diels–Alder reaction with inverse electron demand utilizing **12** and the aromatic alkynes **13a–c** to provide novel derivatives.

Reduction of **14a–c** and conversion of the resulting dialcohols **15a–c** yielded 3,6-bis(chloromethyl)pyridazines **16a–c**. From the latter resulted the corresponding diphosphonates **17a–c** that underwent a Horner–Wadsworth–Emmons reaction with aromatic aldehydes to yield the desired bis(arylvinyl)pyridazines **8a–e** (Table 1).

For all compounds we calculated¹³ the absorption maxima and determined the absorption and emission maxima in solution. In a preliminary in vitro study, the synthesized dyes were applied to human brain tissue with AD pathology.¹⁵ The affinity to tau fibrils and A β plaques was evaluated qualitatively by fluorescence microscopy.¹³ All of the tested compounds showed good to excellent staining of both tau fibrils and A β plaques at high contrast, low background staining, and high photostability in accord with immunohistochemical staining applying the antibodies anti-PHF-Tau clone AT8 mAb for tau deposits and amyloid A4 for A β plaques (Figure 3A–D).

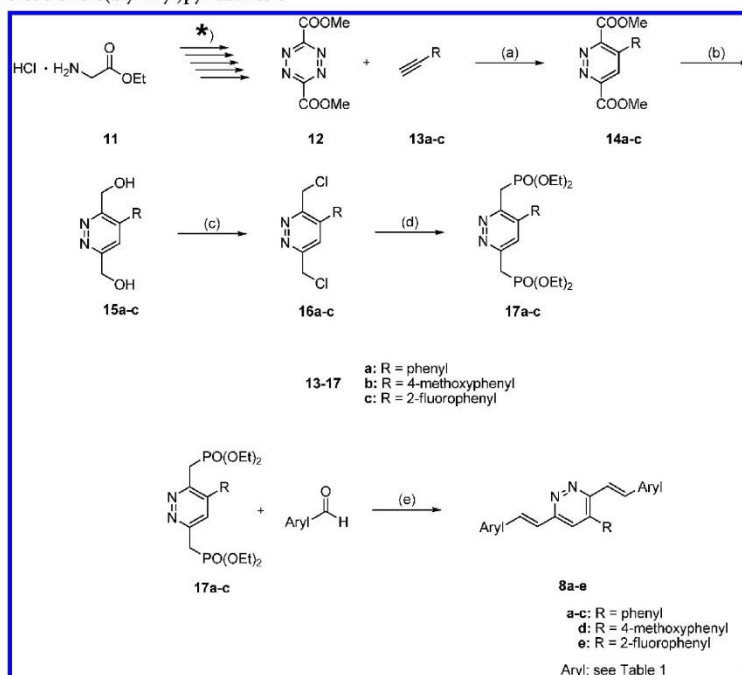
Though staining with antibodies is still the generally accepted benchmark to evaluate new imaging markers, antibodies often display a lack of sensitivity. AT8-staining fails to detect up to 38% of neurofibrillary tangles.¹⁶ Especially so-called ghost tangles, which are released from affected neurons after cell-degeneration and are typical of late stages of AD, do not show any positive immune-tau-staining.¹⁷ Indeed the detection of ghost tangles is of high interest if it comes to a *postmortem*

classification of the stage of AD at hand. They may be identified by immunostaining of ubiquitin, a polypeptide, which is also a part of neurofibrillary tangles. Because ubiquitin is expressed in all eukaryotic cells, it is not a specific indicator however.¹⁸ Our ligands stain both intracellular fibrillar threads of tau and apparent extracellular aggregates of tau (Figure 3E). In addition to extracellular A β plaques, brain matter affected by AD pathology harbors additional amyloid deposits within the vascular walls of blood vessels called A β -angiopathies, which are also considerably stained by **6a** (Figure 3F).¹⁹ The primary screen on human AD brain preparations filtered test compounds for tau-staining properties. Eventually all tau positives also stained amyloid plaques, yet at variable degree. Thus, all AD-related pathological protein deposits are stained by our dyes in a one-time procedure and can be detected by fluorescence microscopy. One example is provided in Figure 3.¹³

Histological in vitro staining experiments provide little information on absolute affinities and are not directly comparable with respect to prospective in vivo imaging. Thus, we developed a new in vitro affinity assay to determine the IC₅₀ values versus thiazine red displacement from aggregated tau and A β ₄₀.¹³ Thiazine red was selected as reference marker because it was previously shown to be an accurate marker for β -pleated sheet structures and to reliably stain A β plaques, tau fibrils, and diffuse neurofibrillary tangles (*K*_d for aggregated tau = 18 nM, *K*_d for aggregated A β = 49 nM).^{13,16,20,21} We evaluated the established A β marker **5** in this assay. ¹¹C-labeled **5** was reported to display an affinity of *K*_i = 26.8 nM to aggregated A β ₄₀ in a displacement assay versus unlabeled **5**.⁸ In our assay it turned out to be a much weaker ligand in competition to thiazine red, displaying an IC₅₀ of 140 nM on A β ₄₀. All IC₅₀ values are listed in Table 1. Almost all of our compounds show higher affinity to aggregated tau than to A β ₄₀, except for **7c**. Even though **5** is considered a selective amyloid marker, we could only determine a 1.8-fold higher

D

dx.doi.org/10.1021/jm300653b | J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Scheme 3. Synthesis of Bis(arylvinyl)pyridazines 8^a

^a(*) Five-step synthesis of tetrazinedimethylcarboxylate **12** according to a published procedure¹² and further five-step conversion of **12** to bis(arylvinyl)pyridazines **8a–e**: (a) dioxane, reflux; (b) LiAlH₄, 60 °C; (c) SOCl₂, CH₂Cl₂, rt; (d) P(OEt)₃, 110 °C; (e) NaH, dimethylformamide (DMF), rt.

affinity to A β over tau. It is reported that the relative amounts of amyloid and tau deposits require a 20- to 50-fold higher selectivity toward tau to allow in vivo detection of tau. Compounds that do not reach this threshold are limited to the detection of tau in the entorhinal cortex.²² If it comes to tau-selective markers, **7e** meets this criterion. **7a** has a comparable tau affinity; however, it is just 13.5-fold higher than its A β affinity. Caveat: This selectivity was observed in in vitro assays, which may not reflect the physiological situation in vivo.

A distinct structure–activity relationship cannot be deduced from the affinity results. The variable substituents of the tested molecules do not solely account for a probe's affinity, although a trend can be observed indicating that *N*- or *O*-containing substituents in the para position on the aromatic flanks drastically increase affinity. Nevertheless, they do not guarantee high affinity; both shape and size of the entire molecule seem to provide an equipotent influence: **6e** shows a very high affinity to aggregated tau (IC₅₀ = 6 nM) and a moderate one to A β ₄₀ (IC₅₀ = 43 nM). Its angular isomer **7b** shows no notable affinity to tau or A β ₄₀ at all. **8b** has a nearly linear equilibrium structure in its electronic ground state; the additional phenyl ring on the pyridazine core buckles the angle between the 4-morpholinostyryl branches marginally but significantly enlarges the size of the molecule, which seems to strongly diminish its target affinity (aggr. tau IC₅₀ = 4707 nM, aggr. A β ₄₀ IC₅₀ = 7591 nM). This observation is valid for all tested bis(arylvinyl)-

phenylpyridazines **8**. They all show an extremely low target binding. Where a direct comparison is possible, bis(arylvinyl)pyridazines **6** show higher affinities than their bis(arylvinyl)pyrimidine isomers **7**. On the other hand, angular bis(arylvinyl)pyrimidines **7** can show high to excellent affinity, especially **7a**, **7e**, and **7f**. Because a general correlation between substitution pattern and affinity does not seem to exist, we tried to correlate affinities to physicochemical parameters, starting with the calculated cLogP values (Table 1). We clearly emphasize that these values are obtained from calculations based on specific algorithms for calculating cLogP from fragment-based methods and can differ from experimental determinations by a value of 2–3.¹⁴ (For **5** the calculated cLogP value is 5.35 whereas the experimentally determined value is reported as 2.6).⁸ The plotting of the IC₅₀ values against the cLogP values indicates a lack of exploitable correlation.¹³

Besides, polarizability has been proposed as a descriptor for tau binding affinity within individual scaffold families.²³ Inspired by these results, we calculated the static electronic polarizabilities α' of our compounds (Table 1) and plotted the corresponding IC₅₀ values against them.¹³ Again, there is no significant correlation between polarizability and affinity of this ligand series to tau and A β .¹³ Because of the poor correlation of both cLogP and static electronic polarizability α' to both tau and A β affinity, neither parameter seems useful for further

E

dx.doi.org/10.1021/jm300653b | J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

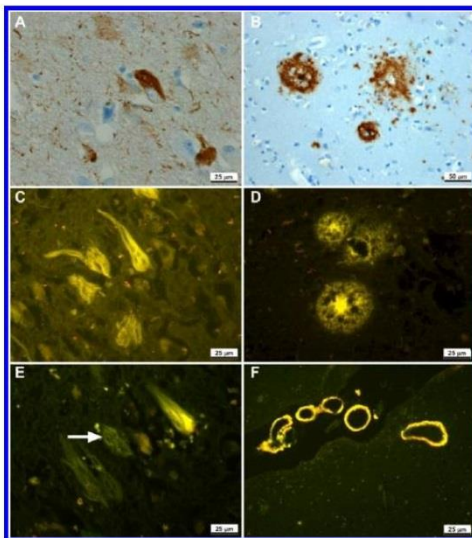


Figure 3. AD-related deposits on human brain tissue: (top) immunohistologically stained tau fibrils with antibody AT8 mAb (A) and A β plaques with antibody amyloid A4 (B); (middle) tau fibrils (C) and A β plaques (D) stained with 6a; (bottom) intracellular tau tangle and extracellular tau tangles (arrow-marked) (E) and A β angiopathy (F) stained with 6a.¹⁵

improvement of our markers. Because 7a and 7e show the highest affinity to aggregated tau (7a, IC₅₀ = 4 nM; 7e, IC₅₀ = 2 nM) over a moderate A β affinity (7a, IC₅₀ = 54 nM; 7e, IC₅₀ = 52 nM), we decided to test both compounds in vivo. After the toxicological evaluation in human liver carcinoma cell lines, Hep G2 did not show any significant decline in cell vitality. We evaluated selected candidates in vivo in a transgenic mouse model.^{13,24} However, recent in vivo studies and histological staining experiments indicate severe discrepancies between labeling experiments of human and murine tau, which refers to significant conformational differences between the two, and suggest the absence of the appropriate ligand-binding sites on transgenic murine tau versus human tau aggregates.²⁵ Thus, we relied on the A β affinity of both ligands to determine the brain permeability and bioavailability in a transgenic mouse model overexpressing A β (APP_{swE}PS1 Δ E9) and equipped with a cranial window. Although 7e did not show any positive results, A β plaques were very well detectable with 7a in the mouse brain by in vivo fluorescence microscopy 4 h after injection of 2 mg/kg (Figure 4A). Counterstaining with 5 was performed in the same mouse 2 days later by the additional injection of 2 mg/kg and confirmed the results as the areas stained by 7a were overlaid by the areas stained by 5 (Figure 4B).

The fluorescence properties of 7a in solution are characterized by a broad excitation range and a remarkable Stokes shift of about 140 nm (Figure 5A). The emission of 7a after target binding shows a maximum at 510 nm, which enables for an easy distinction from stained lipofuscin deposits at 570 nm, whose accumulation is also implicated in several neurodegenerative diseases (Figure 5B and C).²⁶

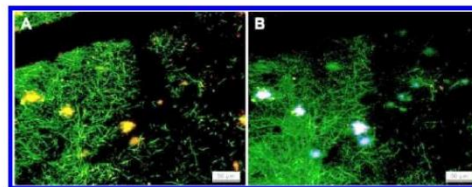


Figure 4. (A) Detection of A β plaques stained with 7a in APP_{swE}PS1 Δ E9 transgenic mouse model (2 mg/kg intraperitoneal injection (ip) after 4 h) through cranial window in vivo. (B) Counterstaining by additional injection of 5 in the same mouse on day 2 (2 mg/kg ip after 4 h).^{13,24}

CONCLUSION AND OUTLOOK

In summary, we present a series of fluorescent probes for in vitro detection of AD-associated protein deposits in human brain tissue by fluorescence microscopy, offering a broad excitation and emission range by the choice of suitable candidates. Two of these compounds (7a and 7e) even show a remarkably higher selectivity for aggregated tau, which qualifies for further tau-selective imaging techniques with respect to an early-onset diagnosis of AD. The ability of 7a to pass the blood–brain barrier was demonstrated in a transgenic mouse model by the A β binding of that compound in vivo. In the course of our histological studies of ligand profiling on human AD-altered brain material, we discovered that certain areas of the olfactory epithelium, which can be considered an extension of the brain actually, harbor tau deposits.^{13,15} These are the Bowman's glands, which are involved in the production of nasal discharge but also contain nerve tissue (Figure 6B–D). Our staining results correlated with TAU Ab-3 immunostaining (Figure 6A) and thioflavin-S-staining (data not shown), whereas no A β deposits could be observed in these regions.

These findings have been confirmed within the investigation of olfactory epithelium tissue of 20 confirmed AD patients (classification analysis: NIA Reagan Institute criteria²⁷) in comparison to 5 healthy controls. The severity of tau load in the Bowman's glands and its correlation to the progress of AD is subject to ongoing investigation. These results hold potential to detect AD-related tau deposits endoscopically and, therefore, noninvasively in the olfactory epithelium at very high resolution. The advantages of such a method compared to imaging techniques based on radiotracers, which require elaborate infrastructure and on-site radiochemical synthesis of suitable tracers, are apparent. Moreover, the diameter of a Bowman's gland is ~50 μ m, which is far below the resolution of PET or SPECT probes. These are thus limited to the quantification of an averaged protein deposition, which in turn is rather low prior to the onset of symptoms, resulting in a signal-to-noise limitation of these techniques.

The applied fluorescent markers for Bowman's gland imaging should display cell permeability whereas a brain penetration would no longer be necessary, since the olfactory bulb is not confined by the blood–brain barrier. A contamination of the brain by brain-penetrating markers and their metabolites may be avoided, since tracers as 5 clear from the brain extremely slowly and can still be detected 100 days post injection (pi) at barely diminished intensity compared to day 1 pi.¹⁰

F

dx.doi.org/10.1021/jm300653b | J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

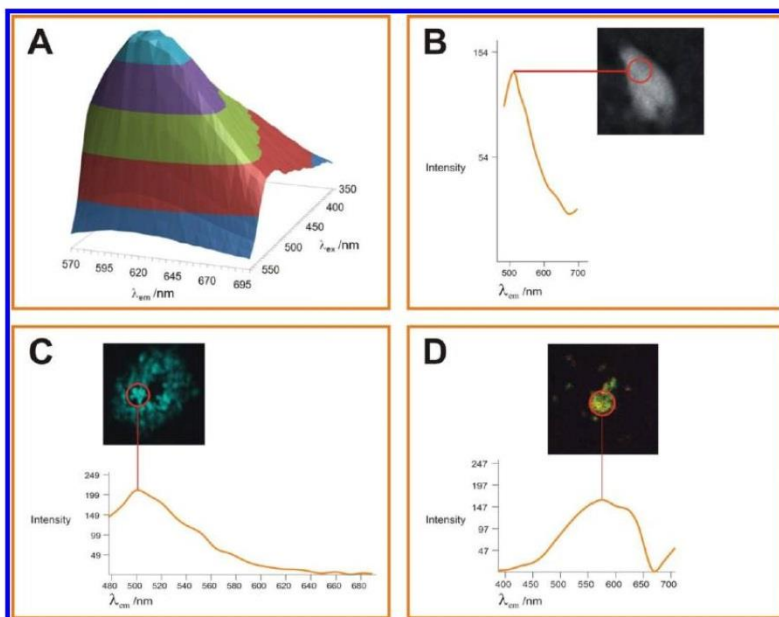


Figure 5. (A) 2D absorption/emission spectra of 7a (measured in methanol). (B–D) In vitro on target emission spectra of 7a on human hippocampal tissue [(B) tau fibril; (C) A β plaque; (D) lipofuscin].¹³

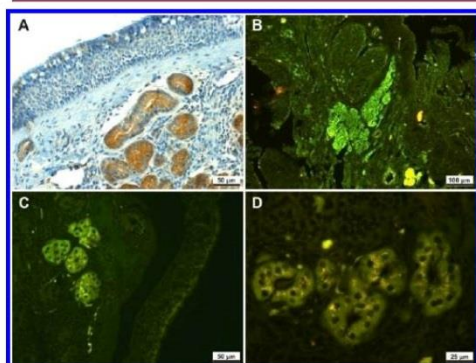


Figure 6. Bowman's glands of the olfactory epithelium containing tau aggregates extracted from a deceased AD patient (88y, Braak V, CERAD C): (A) immunohistological staining with antibody TAU Ab-3; (B) stained with 7a; (C and D) stained with 6a.^{13,15}

EXPERIMENTAL SECTION

General Information. All chemicals were purchased as reagent grade from commercial suppliers and used without further purification, unless otherwise noted. Proton (^1H NMR) and carbon (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectra were recorded on Bruker DRX 500 at 500 and 125.75 MHz, respectively, at 293 K. The chemical shifts are given in parts per million (ppm) on the delta scale (δ) and are referenced to tetramethylsilane ($\delta = 0$ ppm). ^1H NMR. Abbreviations for NMR data: s = singlet; d = doublet; t = triplet; q

= quartet; qi = quintet; dd = doublet of doublets; dt = doublet of triplets; dq = doublet of quartets; tt = triplet of triplets; m = multiplet. Coupling constants (J values) are given in hertz (Hz). Mass spectra were recorded on a Finnigan MAT 95 magnetic sector spectrometer. Thin-layer chromatography (TLC) was performed using Merck TLC silica gel 60 F 254 (0.2 mm) on aluminum sheets. Silica gel columns for chromatography were prepared with E. Merck silica gel 60 (0.063–0.20 mesh ASTM). UV/vis-spectra in methanolic solution were recorded using a Shimadzu UV-2401 PC UV-vis recording spectrometer; fluorescence spectra in methanolic solution were recorded using a Shimadzu RF-1501 spectrofluorophotometer. 2D fluorescence spectra were recorded on a Tecan Infitite M1000.

High-performance liquid chromatographies (HPLC) were carried out on an Agilent 1100 (column: reversed phase, Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6 mm \times 150 mm; detector: Agilent 1100 series refractive index detector, 254 nm). Solvent gradient = 90% A at 0 min, 30% A at 2 min, 10% A at 5 min; solvent A = 0.1% trifluoroacetic acid in water; solvent B = acetonitrile; flow rate = 1.0 mL/min; temperature = 35 $^\circ\text{C}$.

All compounds that were evaluated in biological assays had >95% purity, which has been determined using this method.

Synthesis of Bis(arylviny)pyrazines (6a–h) and Bis(arylviny)pyrimidines (7a–e). 2,5-Dimethylpyrazine (0.125 g, 1.16 mmol) or 4,6-dimethylpyrimidine (0.125 g, 1.16 mmol) was dissolved in 10 mL of dry dimethylformamide, potassium *tert*-butoxide (0.26 g, 2.31 mmol) was added, and the mixture was heated to 80 $^\circ\text{C}$. After 15 min, the corresponding aromatic aldehyde (2.31 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 4 h at 80 $^\circ\text{C}$. After cooling to ambient temperature, the resulting solid was filtered off and washed with ethyl acetate. If necessary, the obtained product was purified by column chromatography.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(Pyrazine-2,5-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (6a). Yield 0.370 g, 86%, red solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 3.02 (12H, s), 6.72 (4H, d, $J = 8.9$ Hz), 6.96 (2H, d, $J = 16$ Hz), 7.49 (4H, d, $J = 8.9$ Hz), 7.62 (2H, d, $J = 16$ Hz),

G

dx.doi.org/10.1021/jm300653b | J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

8.49 (2H, s). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 39.3, 111.2, 118.7, 123.7, 127.5, 132.8, 141.7, 148.0, 149.7. HPLC: 98%; t_R = 3.20 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_4$, 370.2158; found, 370.21641.

2,5-Bis((E)-2-(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrazine (6b). Yield 0.301 g, 89%, orange solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 3.76 (6H, s), 6.19 (2H, m), 6.65 (2H, m), 6.70 (2H, m), 6.88 (2H, d, J = 15.6 Hz), 7.62 (2H, d, J = 15.6 Hz), 8.40 (2H, s). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 33.3, 107.8, 107.9, 119.3, 120.6, 124.1, 130.5, 142.1, 147.8. HPLC: 96%; t_R = 7.53 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4$, 290.1532; found, 290.15118.

2,5-Bis(4-methoxystyryl)pyrazine (6c). Yield 0.322 g, 80%, yellow solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 3.85 (6H, s), 6.93 (4H, d, J = 9 Hz), 7.04 (2H, d, J = 16 Hz), 7.55 (4H, d, J = 9 Hz), 7.67 (2H, d, J = 16 Hz), 8.54 (2H, s). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 53.4, 112.3, 120.0, 126.7, 131.7, 141.0, 146.9, 158.3. HPLC: 99%; t_R = 4.63 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$, 344.1525; found, 344.15173.

2,5-Bis(4-isopropylstyryl)pyrazine (6d). Yield 0.373 g, 86%, light yellow solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.28 (12H, d, J = 6.9 Hz), 2.94 (2H, d, J = 6.9 Hz), 7.14 (2H, d, J = 16.1 Hz), 7.26 (4H, d, J = 8.1 Hz), 7.54 (4H, d, J = 8.1 Hz), 7.71 (2H, d, J = 16.1 Hz), 8.58 (2H, s). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 23.9, 34.0, 123.3, 127.0, 127.3, 134.0, 134.2, 143.1, 149.1, 150.0. HPLC: 97%; t_R = 5.25 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2$, 368.2253; found, 368.22192.

2,5-Bis(4-morpholinostyryl)pyrazine (6e). Yield 0.417 g, 79%, orange solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 3.25 (8H, t, J = 4.8 Hz), 3.90 (8H, t, J = 4.8 Hz), 6.95 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.03 (2H, d, J = 16.2 Hz), 7.53 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.66 (2H, d, J = 16.2 Hz), 8.53 (2H, s). HPLC: 99%; t_R = 7.35 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2$, 454.2369; found, 454.2354.

2,5-Bis(4-(4-methylpiperazin-1-yl)styryl)pyrazine (6f). Yield 0.463 g, 83%, yellow solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 2.36 (s, 6H), 2.58 (8H, t, J = 5.0 Hz), 3.30 (8H, t, J = 5.0 Hz), 6.92 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.00 (2H, d, J = 16.1 Hz), 7.50 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.63 (2H, d, J = 16.1 Hz), 8.51 (2H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 45.2, 47.3, 54.0, 114.4, 120.1, 126.4, 127.4, 132.6, 141.9, 148.0, 150.4. HPLC: 98%; t_R = 1.80 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{N}_6$, 480.3003; found, 480.30034.

2,5-Bis(4-(piperidin-1-yl)styryl)pyrazine (6g). Yield 0.413 g, 79%, orange solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 1.61 (4H, m), 1.70 (8H, m), 3.26 (8H, t, J = 5.3 Hz), 6.91 (4H, d, J = 8.5 Hz), 6.99 (2H, d, J = 15.9 Hz), 7.49 (4H, d, J = 8.5 Hz), 7.62 (2H, d, J = 15.9 Hz), 8.50 (2H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 24.4, 25.6, 49.7, 115.6, 120.6, 126.7, 128.4, 133.7, 142.8, 149.0, 152.1. HPLC: 96%; t_R = 6.51 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_4$, 450.2784; found, 450.27531.

2,5-Bis(4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)pyrazine (6h). Yield 0.402 g, 82%, brown solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 2.03 (8H, m), 3.34 (8H, t, J = 6.6 Hz), 6.56 (4H, d, J = 8.7 Hz), 6.93 (2H, d, J = 16.0 Hz), 7.48 (4H, d, J = 8.7 Hz), 7.61 (2H, d, J = 16.0 Hz), 8.48 (2H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 25.5, 47.6, 111.8, 119.0, 123.9, 128.7, 134.0, 142.7, 149.0, 151.3. HPLC: 99%; t_R = 6.28 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_4$, 422.2471; found, 422.24976.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(Pyrimidine-4,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (7a). Yield 0.383 g, 89%, yellow solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 2.93 (12H, s), 6.62 (4H, d, J = 8.6 Hz), 6.76 (2H, d, J = 15.8 Hz), 7.06 (1H, s), 7.42 (4H, d, J = 8.6 Hz), 7.73 (2H, d, J = 15.8 Hz), 8.90 (1H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 40.6, 112.4, 115.4, 121.2, 124.2, 129.5, 137.6, 151.5, 158.5, 163.4. HPLC: 98%; t_R = 6.35 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_4$, 370.2158; found, 370.21534.

4,6-Bis(4-morpholinostyryl)pyrimidine (7b). Yield 0.464 g, 88%, yellow solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 3.24 (8H, t, J = 5.0 Hz), 3.87 (8H, t, 5.0 Hz), 6.91 (4H, d, J = 8.9 Hz), 6.91 (2H, d, J = 15.9 Hz), 7.20 (1H, s), 7.53 (4H, d, J = 8.9 Hz), 7.82 (2H, d, J = 15.9 Hz), 9.03 (1H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 48.4, 66.7, 115.0, 115.7, 122.8, 127.0, 129.0, 136.6, 151.9,

158.6, 163.0. HPLC: 96%; t_R = 6.48 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2$, 454.2369; found, 454.23502.

4,6-Bis(4-(4-methylpiperazin-1-yl)styryl)pyrimidine (7c). Yield 0.468 g, 84%, yellow solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 2.35 (6H, s), 2.57 (8H, t, J = 5.1 Hz), 3.30 (8H, t, J = 5.1 Hz), 6.89 (2H, d, J = 15.9 Hz), 6.91 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.19 (1H, s), 7.51 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.81 (2H, d, J = 15.9 Hz), 9.02 (1H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 45.2, 47.1, 48.0, 53.9, 114.2, 114.5, 121.2, 121.6, 125.6, 128.0, 135.6, 150.8, 157.6, 162.0. HPLC: 99%; t_R = 1.80 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_6$, 480.3003; found, 480.29930.

4,6-Bis(4-(piperidin-1-yl)styryl)pyrimidine (7d). Yield 0.481 g, 92%, yellow solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 1.60 (8H, t, J = 4.1 Hz), 1.68 (8H, m), 3.27 (8H, t, J = 5.8 Hz), 6.88 (2H, d, J = 15.9 Hz), 6.90 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.18 (1H, s), 7.50 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.80 (2H, d, J = 15.9 Hz), 9.00 (1H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 24.3, 25.6, 49.5, 115.3, 115.4, 122.0, 125.8, 129.0, 136.8, 152.5, 158.5, 163.1, 170.6. HPLC: 98%; t_R = 5.20 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_4$, 450.2784; found, 450.27606.

4,6-Bis(4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)pyrimidine (7e). Yield 0.422 g, 86%, brown solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 2.02 (8H, t, J = 6.5 Hz), 3.34 (8H, t, J = 6.5 Hz), 6.56 (4H, d, J = 8.8 Hz), 6.82 (2H, d, J = 15.9 Hz), 7.14 (1H, s), 7.50 (4H, d, J = 8.8 Hz), 7.80 (2H, d, J = 15.9 Hz), 8.97 (1H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 25.5, 47.6, 111.7, 115.0, 120.4, 123.1, 129.3, 137.2, 148.6, 158.5, 163.2. HPLC: 96%; t_R = 5.07 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_4$, 422.2471; found, 422.24958.

4,4'-(1E,1'E,3E,3'E)-4,4'-(Pyrimidine-4,6-diyl)bis(buta-1,3-diene-4,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (7f). Yield 0.358 g, 73%, red solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 2.93 (12H, s), 6.41 (2H, d, J = 15.1 Hz), 6.61 (4H, d, J = 8.7 Hz), 6.75 (4H, d, J = 5.1 Hz), 6.98 (1H, s), 7.31 (4H, d, J = 8.7 Hz), 7.57 (2H, m), 8.90 (1H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 39.3, 111.2, 114.3, 122.5, 123.9, 126.0, 127.3, 137.2, 137.7, 149.7, 157.5, 161.8. HPLC: 99%; t_R = 5.88 min. HRMS: calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_4$, 422.2471; found, 422.24540.

Synthesis of Dimethyl 4-Arylpyridazine-3,6-dicarboxylates (14a–c). Dimethyl 4-arylpyridazine-3,6-dicarboxylates (14a–c) were obtained according to a published procedure.¹²

Dimethyl 4-Phenylpyridazine-3,6-dicarboxylate (14a). Yield 3.302 g, 96%, brown solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 3.87 (3H, s), 4.10 (3H, s), 7.56 (5H, m), 8.27 (1H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 53.3, 53.6, 127.9, 128.2, 129.2, 130.2, 133.9, 140.0, 151.7, 154.3, 164.1, 165.5. EI-MS: m/z = 272 [M]⁺.

Dimethyl 4-(4-Methoxyphenyl)pyridazine-3,6-dicarboxylate (14b). Yield 0.751 g, 74%, yellow solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 3.86 (3H, s), 3.90 (3H, s), 4.09 (3H, s), 8.23 (1H, s), 7.39 (2H, d, J = 8.9 Hz), 7.01 (2H, d, J = 8.9 Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 53.3, 53.6, 55.5, 114.8, 125.9, 127.8, 129.6, 139.5, 151.6, 154.3, 161.4, 164.2, 165.9. EI-MS: m/z = 302 [M]⁺.

Dimethyl 4-(2-Fluorophenyl)pyridazine-3,6-dicarboxylate (14c). Yield 1.07 g, 73%, brown solid. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 3.93 (3H, s), 4.10 (3H, s), 7.25 (4H, m), 8.26 (1H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 300 K): δ [ppm] = 53.3, 53.6, 115.9, 122.4, 125.0, 129.4, 130.1, 132.2, 135.6, 151.9, 153.4, 159.0, 163.6, 164.7. EI-MS: m/z = 290 [M]⁺.

Synthesis of (4-Arylpyridazine-3,6-diyl)dimethanols (15a–c). 4-Arylpyridazine-3,6-diyl)dimethanols (15a–c) were obtained according to a published procedure.¹²

(4-Phenylpyridazine-3,6-diyl)dimethanol (15a). Yield 0.551 g, 51%, brown oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 300 K): δ [ppm] = 3.22 (2H, s), 4.88 (2H, s), 5.04 (2H, s), 7.47 (1H, s), 7.41 (5H, m). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 61.8, 63.5, 125.1, 128.3, 129.1, 129.6, 134.5, 140.2, 157.5, 161.0. EI-MS: m/z = 216 [M]⁺.

(4-(4-Methoxyphenyl)pyridazine-3,6-diyl)dimethanol (15b). Yield 0.948 g, 77%, brown oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 300 K): δ [ppm] = 3.22 (2H, s), 3.92 (3H, s), 4.88 (2H, s), 5.04 (2H, s), 7.02 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.51 (1H, s), 7.55 (2H, d, J = 9.0 Hz). ^{13}C NMR

H

dx.doi.org/10.1021/jm300653b1J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

(CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 53.4, 62.9, 66.4, 114.6, 126.2, 132.8, 135.2, 141.3, 156.9, 158.4, 161.2. EI-MS: m/z = 246 [M]⁺.

(4-(2-Fluorophenyl)pyridazine-3,6-diyl)dimethanol (**15c**). Yield 0.761 g, 65%, brown oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): δ [ppm] = 4.78 (2H, s), 4.99 (2H, s), 7.52 (4H, m), 7.58 (1H, s). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 62.1, 64.0, 127.5, 127.9, 128.2, 128.3, 131.8, 132.9, 138.1, 141.9, 158.5, 161.2. EI-MS: m/z = 234 [M]⁺.

Synthesis of 3,6-Bis(chloromethyl)-4-arylpyridazines (16a–c). To a solution of the corresponding (4-arylpyridazine-3,6-diyl)-dimethanol (**15a–c**) (1.5 mmol) in dichloromethane, SOCl₂ (0.450 g, 3.75 mmol) was added, and the solution was stirred at ambient temperature for 20 min, during which its color changed from brown to dark red. After the addition of water and extraction with dichloromethane, the united organic layers were dried over sodium sulfate. The resulting product could be used for the next step without further purification.

3,6-Bis(chloromethyl)-4-phenylpyridazine (16a). Yield 0.114 g, 30%, red oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): δ [ppm] = 4.84 (2H, s), 4.94 (2H, s), 7.41 (5H, m), 7.63 (1H, s). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 42.7, 44.2, 127.1, 128.4, 129.0, 129.6, 134.9, 141.6, 156.8, 158.9. EI-MS: m/z = 253 [M]⁺.

3,6-Bis(chloromethyl)-4-(4-methoxyphenyl)pyridazine (16b). Yield 0.149 g, 35%, red oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): δ [ppm] = 3.89 (3H, s), 4.86 (2H, s), 4.94 (2H, s), 7.06 (2H, d, J = 8.9 Hz), 7.47 (2H, d, J = 8.9 Hz), 7.60 (1H, s). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 42.8, 44.1, 53.4, 127.4, 127.9, 129.2, 131.7, 135.0, 142.5, 153.8, 158.3. EI-MS: m/z = 283 [M]⁺.

3,6-Bis(chloromethyl)-4-(2-fluorophenyl)pyridazine (16c). Yield 0.317 g, 78%, brown oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 300 K): δ [ppm] = 4.83 (2H, s), 4.92 (2H, s), 7.56 (4H, m), 7.61 (1H, s). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 42.7, 44.2, 127.1, 128.4, 129.0, 129.2, 130.6, 131.1, 136.8, 142.3, 155.8, 160.9. EI-MS: m/z = 271 [M]⁺.

Synthesis of Tetraethyl (4-Arylpyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonates (17a–c). The corresponding dichloride (**16a–c**) (0.5 mmol) was dissolved in P(OEt)₃ (8.310 g, 50 mmol), and the mixture was stirred for 18 h at 110 °C whereupon the color of the solution changed from dark red to black. After cooling to room temperature, residual P(OEt)₃ was distilled off (high vacuum, 100 °C) and the diphosphonate was obtained as a highly viscous dark oil, which was used for the next step without further purification.

Tetraethyl (4-Phenylpyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonate (17a). Yield 0.21 g, 92%, dark brown oil. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ [ppm] = 1.24 (6H, t, J = 7.1 Hz), 1.27 (6H, t, J = 7.1 Hz), 3.60 (2H, d, J = 20.97), 3.61 (2H, d, J = 21.9), 4.06 (4H, m), 4.10 (4H, m), 7.47 (6H, m). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 16.2, 16.4, 31.5, 33.9, 62.3, 62.5, 128.0, 128.8, 128.9, 129.0, 135.9, 141.0, 152.9, 154.0. EI-MS: m/z = 456 [M]⁺.

Tetraethyl (4-(4-Methoxyphenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonate (17b). Yield 0.163 g, 69%, dark brown oil. EI-MS: m/z = 486 [M]⁺.

Tetraethyl (4-(2-Fluorophenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonate (17c). Yield 0.209 g, 88%, dark brown oil. EI-MS: m/z = 472 [M]⁺.

Synthesis of Bis(arylvinyl)pyridazines (8a–e). The corresponding tetraethyl (4-arylpyridazine-3,6-diyl)bis(methylene)diphosphonate (**17a–c**) (0.25 mmol) was dissolved in dry DMF, and NaH (0.024 g, 1 mmol) was added. After stirring for 30 min, a solution of the corresponding aldehyde (0.5 mmol) in dry DMF was added. After stirring for 18 h, 1 N HCl was added and the mixture was extracted with DCM. The united organic layers were washed with saturated brine and dried over sodium sulfate, and the solvent was evaporated. After column chromatography the products were obtained as colored solids.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-Phenylpyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (8a). Yield 0.035 g, 31%, red solid. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ [ppm] = 2.98 (6H, s), 3.02 (6H, s), 6.66 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.73 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.94 (1H, d, J =

15.6 Hz), 7.26 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.37 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.49 (5H, m), 7.51 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.59 (1H, d, J = 16.4 Hz), 8.05 (1H, d, J = 15.6 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 40.2, 40.3, 112.1, 112.3, 117.4, 120.5, 123.4, 124.5, 125.1, 128.6, 128.8, 128.9, 129.1, 129.2, 135.2, 136.9, 138.4, 138.7, 150.7, 150.9, 153.8, 156.1. HPLC: 98%; t_R = 6.88 min. HRMS: calcd. for C₃₀H₃₀N₄, 446.2471; found, 446.24664.

4,4'-(4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-Phenylpyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(4,1-phenylene))dimorpholine (8b). Yield 0.050 g, 37%, red solid. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ [ppm] = 3.19 (4H, t, J = 5.0 Hz), 3.23 (4H, t, J = 5.0 Hz), 3.86 (8H, m), 6.85 (2H, d, J = 9.0 Hz), 6.91 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.01 (1H, d, J = 15.8 Hz), 7.30 (1H, d, J = 16.3 Hz), 7.40 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.43 (1H, s), 7.45 (5H, m), 7.53 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.61 (1H, d, J = 16.3 Hz), 8.06 (1H, d, J = 15.8 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 48.6, 48.6, 66.7, 115.1, 115.2, 119.1, 122.1, 123.6, 127.7, 128.2, 128.5, 128.6, 128.7, 128.9, 129.0, 129.3, 133.9, 134.8, 136.7, 138.5, 151.4, 151.5, 153.7, 156.1. HPLC: 99%; t_R = 7.18 min. HRMS: calcd. for C₃₄H₃₄N₄O₂, 530.2682; found, 530.26589.

3,6-Bis(4-(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)styryl)-4-phenylpyridazine (8c). Yield 0.036 g, 39%, orange solid. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ [ppm] = 8.07 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 7.53–7.44 (m, 5H), 7.23 (s, 1H), 7.00 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.72 (m, 1H), 6.69–6.65 (m, 2H), 6.43 (m, 1H), 6.20 (m, 1H), 6.12 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.72 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 155.6, 153.4, 142.7, 136.6, 131.8, 131.3, 129.0, 128.8, 128.1, 125.2, 124.9, 124.4, 122.5, 121.4, 120.4, 118.3, 108.9, 108.8, 108.6, 108.5, 34.3, 34.2. HPLC: 97%; t_R = 6.63 min. HRMS: calcd. for C₂₄H₂₂N₄, 366.1845; found, 366.18023.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-(4-Methoxyphenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (8d). Yield 0.043 g, 36%, light red solid. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ [ppm] = 2.99 (6H, s), 3.02 (6H, s), 3.91 (3H, s), 6.67 (2H, d, J = 8.7 Hz), 6.73 (2H, d, J = 8.7 Hz), 6.98 (1H, d, J = 15.8 Hz), 7.04 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.22 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.38 (5H, m), 7.51 (2H, d, J = 8.7 Hz), 7.58 (1H, d, J = 16.2 Hz), 8.04 (1H, d, J = 15.8 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz, 300 K): δ [ppm] = 40.2, 40.3, 55.4, 112.2, 112.2, 114.2, 117.9, 120.9, 123.1, 124.6, 125.2, 128.5, 128.7, 129.2, 130.5, 133.9, 134.8, 137.8, 150.7, 150.8, 153.9, 156.2, 160.0. HPLC: 98%; t_R = 7.27 min. HRMS: calcd. for C₃₁H₃₂N₄O₂, 476.2577; found, 476.25247.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-(2-Fluorophenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (8e). Yield 0.041 g, 35%, red solid. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ [ppm] = 2.98 (6H, s), 3.02 (6H, s), 6.66 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.73 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.77 (1H, d, J = 15.7 Hz), 7.22 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.25 (6H, m), 7.42 (1H, s), 7.51 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.58 (1H, d, J = 16.4 Hz), 8.05 (1H, d, J = 15.7 Hz). HPLC: 96%; t_R = 6.74 min. HRMS: calcd. for C₃₀H₂₈N₄F₂, 463.2299; found, 463.22797.

Tissue Probe Preparation. Human hippocampal tissue fixed in 10% buffered formalin solution and embedded in paraffin was cut to 4 μ m sections in a microtome and mounted on standard microscope slides. Subsequent deparaffinization was carried out in xylol (15 min), ethanol 100% (10 min), ethanol 96% (10 min), and ethanol 70% (10 min). Until subsequent processing, the slides were stored in water.

Immunohistochemical Staining. Immunohistochemical staining was performed on 4 μ m sections by using a Ventana Benchmark automated stainer (Ventana, Tuscon, AZ) applying the antibodies anti-PHF-Tau clone AT8 mAb (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL), TAU Ab-3 (Neomarkers, Fremont, CA), and amyloid A4 (BAM10, Sigma, St. Louis, MO) and the Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana, Tuscon, AZ).

Histochemical Staining with Fluorescent Dyes. The staining procedure comprises the following steps of brain section treatment: nucleus staining with acidic hematoxylin (10 min), blue annealing by water wash-up (5 min), application of the dye solution (2.5 mM) (10 min), ethanol wash-up, water bath (5 min), 1% acetic acid bath (15 min), water wash-up, and covering with standard glass covers.

Light Microscopy and Fluorescence Microscopy. Four μ m sections stained with fluorescence probes were analyzed by indirect fluorescence microscopy using an Axioskop microscope with a

HBO100 fluorescence illuminator (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with the bandpass filter set 09 BP450-490, FT510, LP515, the filter set 02 G365, FT395, LP420, and the filter set 15 BP546, FT580, LP590 (all Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Digital image processing was done with a Leica DFC 300FX fluorescence camera (Leica Microsystems, Heerbrugg, CH) and the software ImageAccess Premium version 5 (Imagic AG, Galtbrugg, CH).

Thiazine Red Displacement Assay. Recombinant human microtubule associated tau protein purified from *E. coli* was aggregated at a concentration of 5 μ M with arachidonic acid (100 μ M) in Tris 10 mM, pH 8, 24 h at 37 °C. Synthetic A β ₄₀ was aggregated at a concentration of 50 μ M with arachidonic acid (100 μ M) in Tris 10 mM, pH 8, for 3 days at 37 °C, under shaking at 150 rpm.

Thiazine red was added at the concentration corresponding to the K_d of the respective aggregated protein binding site to induce a fluorescent signal that can be inhibited by the addition of a displacer compound. (K_d for aggregated tau = 18 nM, and K_d for aggregated A β = 49 nM.)

To determine the affinity of a displacer compound to the thiazine red binding sites of the aggregated proteins, the compound was added at different concentrations to the assay mixture ranging from 0.1 to 10 000 nM. For the inhibition curve, the compound was measured together with the aggregated proteins and thiazine red. The fluorescence of some dyes overlapped with the fluorescence of thiazine red when measured at 595 nm. Therefore, compounds were also measured together with the aggregated proteins, but without thiazine red (autofluorescence curve) (Figure 7). Net fluorescence was

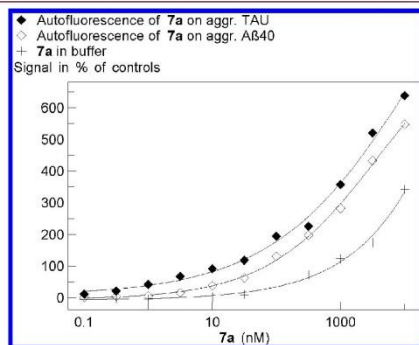


Figure 7. Fluorescence of 7a in buffer or in the presence of aggregated tau or aggregated A β ₄₀.

calculated by subtracting the fluorescence of the wells without thiazine red from the fluorescence of wells containing thiazine red (inhibition curve) (Figure 8).

As negative control, thiazine red and aggregated protein were used. As positive control, thiazine red, reference compound with known activity (see Supporting Information, Table 1), and aggregated protein were used.

The assay was performed in Perkin-Elmer OptiPlate 384, black, 45 mL assay volume. As assay buffer, DPBS (no CaCl₂, no MgCl₂) (GIBCO N. 14020) was used. The tested compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), and 2 μ L of the solution was added to the assay mixture (5% DMSO final). The assay was started by the addition of the aggregated protein (competitive condition). The plates were shortly shaken (1 min with Sterico variomag teleshake) and incubated at room temperature for 30 min. Measurements were performed with En:Vision (Perkin-Elmer), at excitation 531 nm/emission 595 nm. Corresponding IC₅₀ values (inhibitory concentration for 50% decrease) were calculated using the Levenberg–Marquardt algorithm.¹³

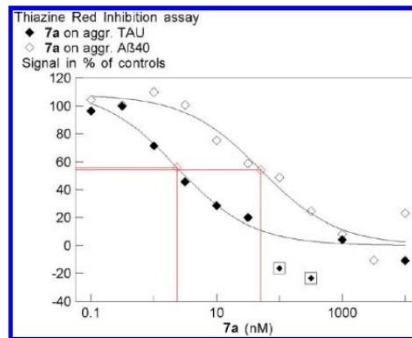


Figure 8. Inhibition curve in thiazine red assay of the compound 7a, with IC₅₀ determination for aggregated tau and aggregated A β ₄₀.

The obtained values are the average values of duplicates of replicate experiments. The statistical presentation follows the guidelines laid out by Cumming et al.²⁸

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Immunohistochemical and histochemical staining, thiazine red displacement assay (further details), correlation of affinities to physicochemical parameters, toxicological evaluations of 7a and 7e, in vivo imaging, computational methods, and compound characterization data (original NMR spectra and HRMS protocols). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Prof. Dr. Boris Schmidt, Clemens Schoepf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt, Germany. E-mail: schmidt_boris@t-online.de. Phone: 49-6151 163075.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare the following competing financial interest(s): we claimed a patent application for the substances listed in this article, DE 10 2010 045 796.5, DE 10 2010 045 797.3, WO2012037928A2.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Bundesministerium fuer Bildung und Forschung, Germany (13N10636).

■ ABBREVIATIONS

α' , static electronic polarizability volume; α , calculated polarizability; CERAD, consortium to establish a registry for Alzheimer's disease; ϵ_0 , vacuum permittivity; ip, intraperitoneal injection; KOtBu, potassium *tert*-butoxide; K_d , dissociation constant; λ_{abs}^{max} , absorption maximum; λ_{em}^{max} , emission maximum; NIA, National Institute on Aging; *n.m.*, not measurable due to spectral overlap with the reference compound thiazine red; pi, post injection; y, years

J

[dx.doi.org/10.1021/jm300653b111](https://doi.org/10.1021/jm300653b111) | J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

REFERENCES

- (1) Wimo, A.; Winblad, B.; Aguero-Torres, H.; von Strauss, E. The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2003**, *17*, 63–67.
- (2) Gandy, S. Perspective: Prevention is better than cure. *Nature* **2011**, *475*, S15.
- (3) Gravitz, L. Drugs: A tangled web of targets. *Nature* **2011**, *475*, S9–S11.
- (4) Klunk, W. E.; Engler, H.; Nordberg, A.; Wang, Y.; Blomqvist, G.; Holt, D. P.; Bergstrom, M.; Savitcheva, I.; Huang, G.-f.; Estrada, S.; Aisen, B.; Debnath, M. L.; Barletta, J.; Price, J. C.; Sandell, J.; Lopresti, B. J.; Wall, A.; Koivisto, P.; Antoni, G.; Mathis, C. A.; Langstrom, B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Ann. Neurol.* **2004**, *55*, 306–319.
- (5) Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; Baumann, K.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B. Curcumin-derived pyrazoles and isoxazoles: Swiss army knives or blunt tools for Alzheimer's disease? *ChemMedChem* **2008**, *3*, 165–172.
- (6) Ono, M.; Hayashi, S.; Matsumura, K.; Kimura, H.; Okamoto, Y.; Ihara, M.; Takahashi, R.; Mori, H.; Saji, H. Rhodanine and thiohydantoin derivatives for detecting tau pathology in Alzheimer's Brains. *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *2*, 269–275.
- (7) Koronyo-Hamaoui, M.; Koronyo, Y.; Ljubimov, A. V.; Miller, C. A.; Ko, M. K.; Black, K. L.; Schwartz, M.; Farkas, D. L. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *NeuroImage* **2011**, *54*, S204–S217.
- (8) Klunk, W. E.; Bacska, B. J.; Mathis, C. A.; Kajdasz, S. T.; McLellan, M. E.; Frosch, M. P.; Debnath, M. L.; Holt, D. P.; Wang, Y.; Hyman, B. T. Imaging A β plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2002**, *61*, 797–805.
- (9) Sadowski, M.; Pankiewicz, J.; Scholtzova, H.; Tsai, J.; Li, Y.; Carp, R. I.; Meeker, H. C.; Gambetti, P.; Debnath, M.; Mathis, C. A.; Shao, L.; Gan, W.-B.; Klunk, W. E.; Wisniewski, T. Targeting prion amyloid deposits in vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2004**, *63*, 775–784.
- (10) Burgold, S.; Bittner, T.; Dorostkar Mario, M.; Kieser, D.; Fuhrmann, M.; Mitteregger, G.; Kretschmar, H.; Schmidt, B.; Herms, J. In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. *Acta Neuropathol.* **2011**, *121*, 327–335.
- (11) Achelle, S.; Noura, I.; Pfaffinger, B.; Ramondenc, Y.; Ple, N.; Rodriguez-Lopez, J. V-shaped 4,6-bis(arylvinyl)pyrimidine oligomers: Synthesis and optical properties. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3711–3717.
- (12) Boger, D. L.; Panek, J. S.; Patel, M. Preparation and Diels–Alder reaction of a reactive, electron-deficient heterocyclic azadiene: Dimethyl 1,2,4,5-tetrazine-3,6-dicarboxylate. 1,2-Diazine (dimethyl 4-phenyl-1,2-diazine-3,6-dicarboxylate) and pyrrole (dimethyl 3-phenyl-pyrrole-2,5-dicarboxylate) introduction. *Org. Synth.* **1992**, *70*, 79–88.
- (13) See Supporting Information for further details.
- (14) cLogP values were determined using the OSIRIS Property Explorer: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.
- (15) Tissue specimens were obtained with patients' informed consent in the course of regular clinical autopsies performed at the Department of Pathology, Klinikum Darmstadt.
- (16) Uchihara, T.; Nakamura, A.; Yamazaki, M.; Mori, O.; Ikeda, K.; Tsuchiya, K. Different conformation of neuronal tau deposits distinguished by double immunofluorescence with AT8 and thiazin red combined with Gallyas method. *Acta Neuropathol.* **2001**, *102*, 462–466.
- (17) Mohorko, N.; Repovs, G.; Popovic, M.; Kovacs, G. G.; Bresjanac, M. Curcumin labeling of neuronal fibrillar tau inclusions in human brain samples. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2010**, *69*, 405–414.
- (18) Bancher, C.; Brunner, C.; Lassmann, H.; Budka, H.; Jellinger, K.; Wiche, G.; Seitelberger, F.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Wisniewski, H. M. Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1989**, *477*, 90–99.
- (19) Kung, M.-P.; Hou, C.; Zhuang, Z.-P.; Skovronsky, D.; Kung, H. F. Binding of two potential imaging agents targeting amyloid plaques in postmortem brain tissues of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res.* **2004**, *1025*, 98–105.
- (20) Luna-Munoz, J.; Peralta-Ramirez, J.; Chavez-Macias, L.; Harrington Charles, R.; Wischik Claude, M.; Mena, R. Thiazin red as a neuropathological tool for the rapid diagnosis of Alzheimer's disease in tissue imprints. *Acta Neuropathol.* **2008**, *116*, S07–S15.
- (21) Mena, R.; Edwards, P.; Perez-Olvera, O.; Wischik, C. M. Monitoring pathological assembly of tau and β -amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **1995**, *89*, S0–S6.
- (22) Schafer Kelsey, N.; Kim, S.; Matzavinos, A.; Kuret, J. Selectivity requirements for diagnostic imaging of neurofibrillary lesions in Alzheimer's disease: A simulation study. *NeuroImage* **2012**, *60*, 1724–1733.
- (23) Jensen, J. R.; Cisek, K.; Honson, N. S.; Kuret, J. Ligand polarizability contributes to tau fibril binding affinity. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, S147–S154.
- (24) All procedures were in accordance with an animal protocol approved by the University of Munich and the government of upper Bavaria (Az. 55.2-1-54-2531-188-09).
- (25) Zhang, W.; Arteaga, J.; Cashion, D. K.; Chen, G.; Gangadharmath, U.; Gomez, L. F.; Kasi, D.; Lam, C.; Liang, Q.; Liu, C.; Mocharla, V. P.; Mu, F.; Sinha, A.; Szardenings, A. K.; Wang, E.; Walsh, J. C.; Xia, C.; Yu, C.; Zhao, T.; Kolb, H. C. A highly selective and specific PET tracer for imaging of tau pathologies. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, DOI: 10.3233/JAD-2012-120712.
- (26) Jung, T.; Bader, N.; Grune, T. Lipofuscin: Formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2007**, *1119*, 97–111.
- (27) Newell, K. L.; Hyman, B. T.; Growdon, J. H.; Hedley-Whyte, E. T. Application of the National Institute on Aging (NIA)–Reagan Institute criteria for the neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1999**, *58*, 1147–1155.
- (28) Cumming, G.; Fidler, F.; Vaux, D. L. Error bars in experimental biology. *J. Cell Biol.* **2007**, *177*, 7–11.

K

dx.doi.org/10.1021/jm300653b | J. Med. Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Supporting Information for

Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines and -pyridazines as
Imaging Agents for Tau Fibrils and β -Amyloid Plaques in
Alzheimer's Disease Models

Alexander Boländer,[†] Daniel Kieser,[†] Constantin Voss,[†] Silvia Bauer,[†] Christian Schön,[‡]
Steffen Burgold,[‡] Tobias Bittner,[‡] Jana Hölzer,[§] Roland Heyny-von Haußen,[‡] Gerhard Mall,[‡]
Valérie Goetschy,[∞] Christian Czech,[∞] Henner Knust,[∞] Robert Berger,[†] Jochen Herms,[‡] Ingrid
Hilger,[§] and Boris Schmidt^{*,†}

[†]Clemens Schoepf-Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt,
Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt, Germany, [‡]DZNE site Munich and Center of Neuropathology Ludwig-
Maximilians- Universität, 81377 Munich, Germany, [§]Institute of Diagnostic and Interventional Radiology I,
Experimental Radiology, Universitätsklinikum Jena, 07747 Jena, Germany, [‡]Department of Pathology, Klinikum
Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany, [∞]F. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basel, Switzerland

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +496151-164531, Fax: +496151-163278

E-mail: schmidt_boris@t-online.de

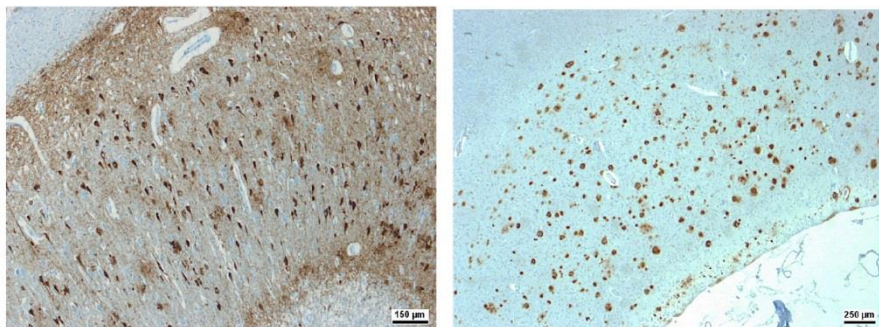
Table of contents:

Immunohistological and Histochemical Staining	S2
Thiazine Red Displacement Assay (further details)	S12
Correlation of Affinities to Physicochemical Parameters	S18
Toxicological Evaluation of 7a and 7e	S19
In Vivo Imaging	S20
Computational Methods	S22
Compound Characterization Data (Original NMR Spectra and HRMS Protocols)	S25

S1

Immunohistological and Histochemical Staining

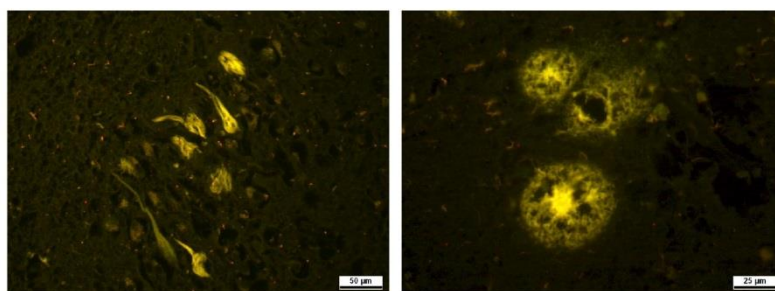
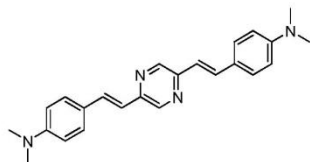
Immunohistochemical Staining



Immunohistochemical staining of tau fibrils (left, antibody AT8 mAb) and A β -plaques (right, antibody Amyloid A4)

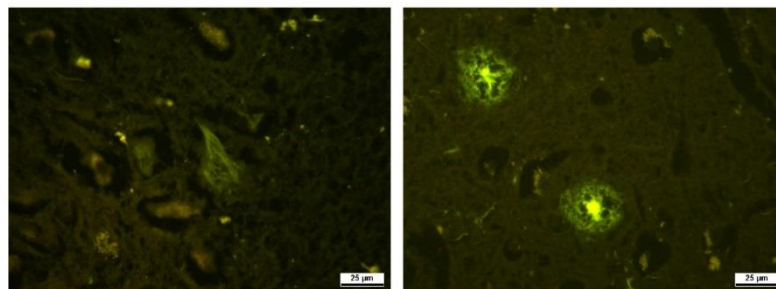
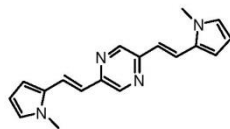
Results of Histochemical Stainig with Compounds **6a-h**, **7a-f** and **8a-e**

4,4'-(1*E*,1'*E*)-2,2'-(pyrazine-2,5-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(*N,N*-dimethylaniline) (**6a**)



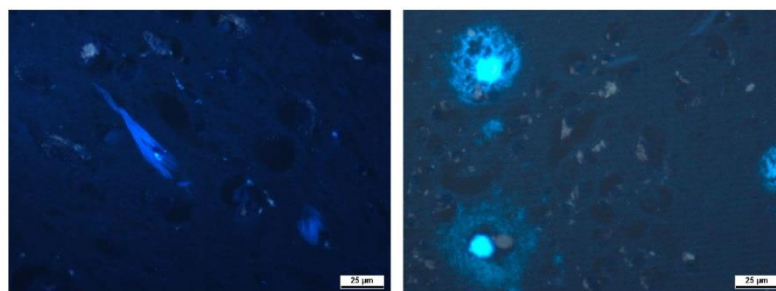
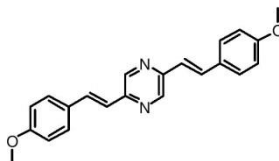
Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6a**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

2,5-Bis((*E*)-2-(1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)vinyl)pyrazine (**6b**)



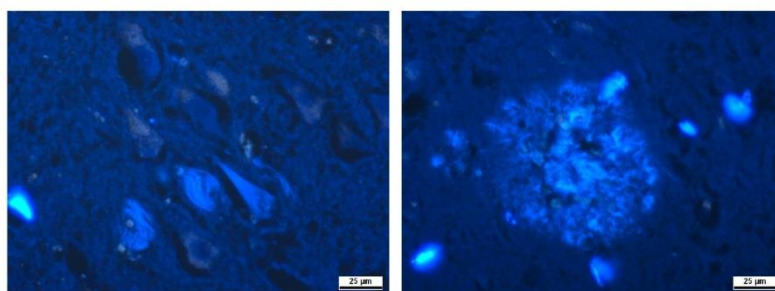
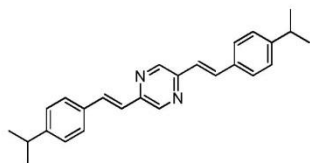
Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **6b**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

2,5-Bis(4-methoxystyryl)pyrazine (**6c**)



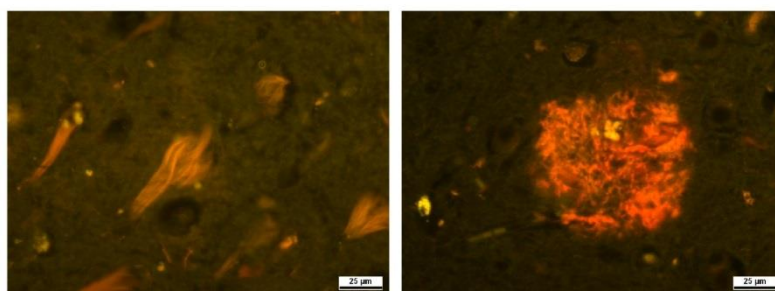
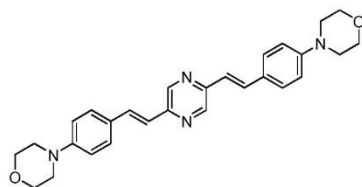
Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **6c**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

2,5-Bis(4-isopropylstyryl)pyrazine (**6d**)



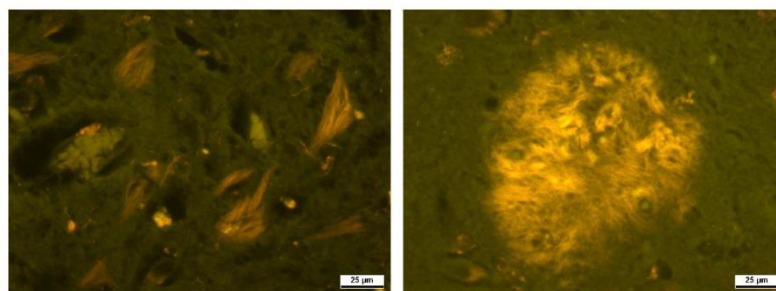
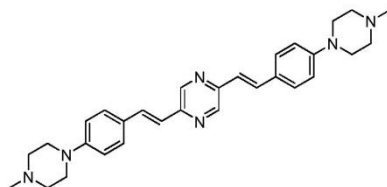
Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **6d**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

2,5-Bis(4-morpholinostyryl)pyrazine (**6e**)



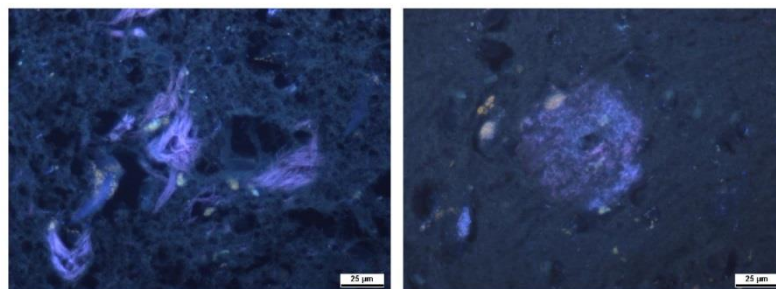
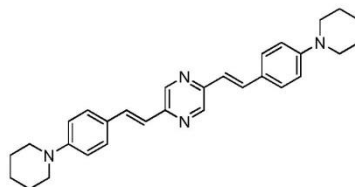
Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6e**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

2,5-Bis(4-(4-methylpiperazin-1-yl)styryl)pyrazine (**6f**)



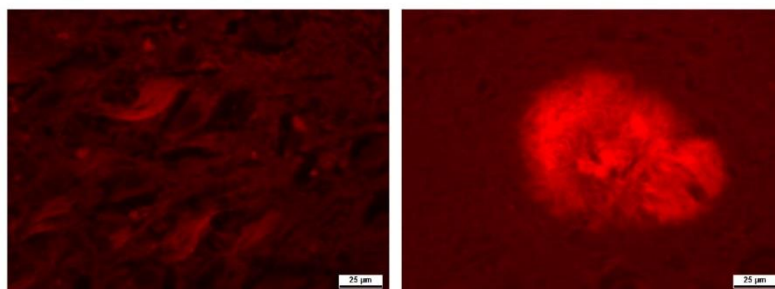
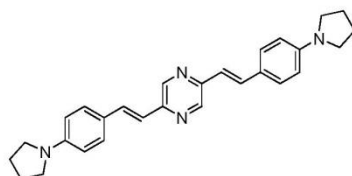
Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6f**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

2,5-Bis(4-(piperidin-1-yl)styryl)pyrazine (**6g**)



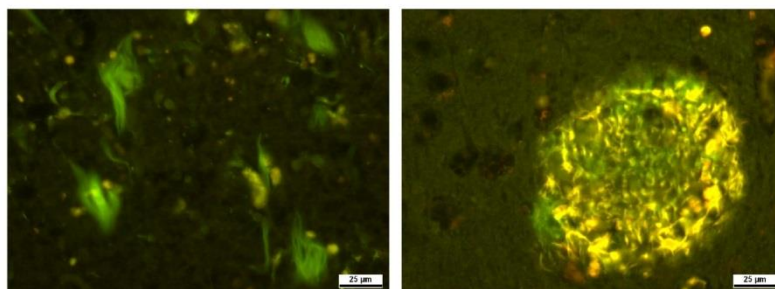
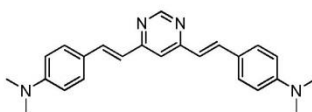
Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **6g**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

2,5-Bis(4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)pyrazine (**6h**)



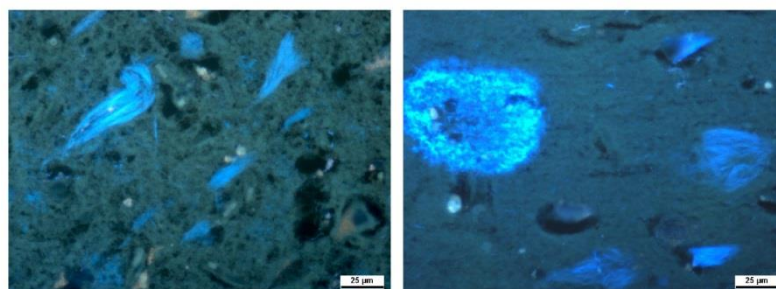
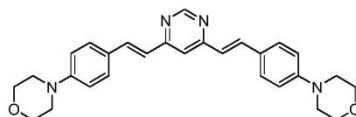
Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **6h**, filter set 15 BP546, FT580, LP590.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(pyrimidine-4,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (**7a**)



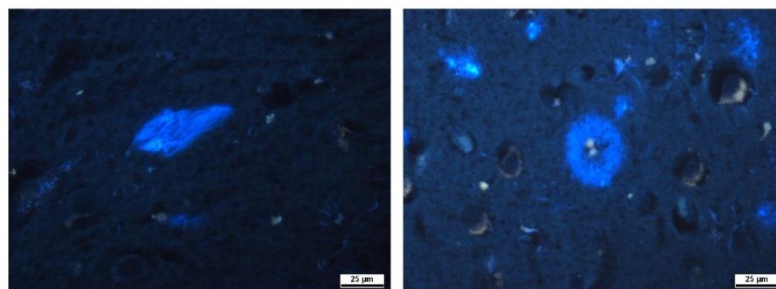
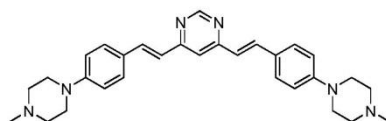
Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **7a**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

4,6-Bis(4-morpholinostyryl)pyrimidine (**7b**)



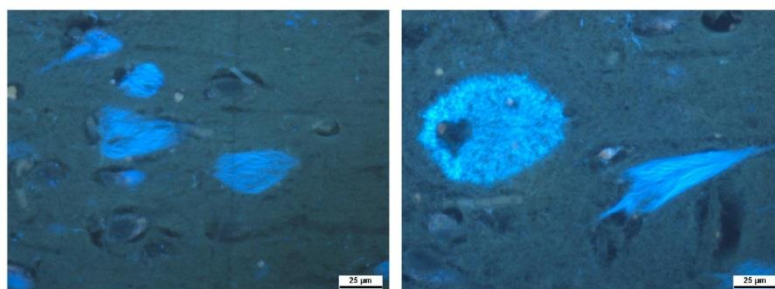
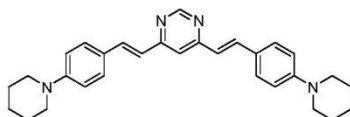
Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **7b**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,6-Bis(4-(4-methylpiperazin-1-yl)styryl)pyrimidine (**7c**)



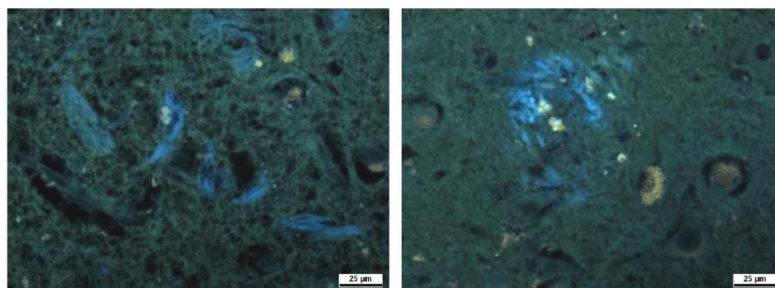
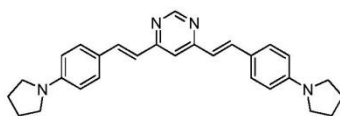
Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **7c**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,6-Bis(4-(piperidin-1-yl)styryl)pyrimidine (**7d**)



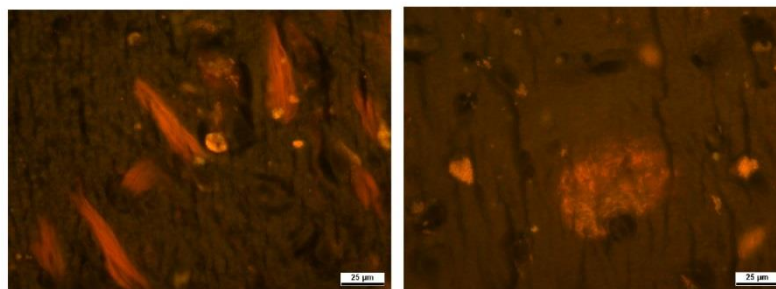
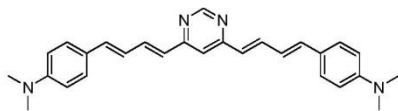
Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **7d**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,6-Bis(4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)pyrimidine (**7e**)



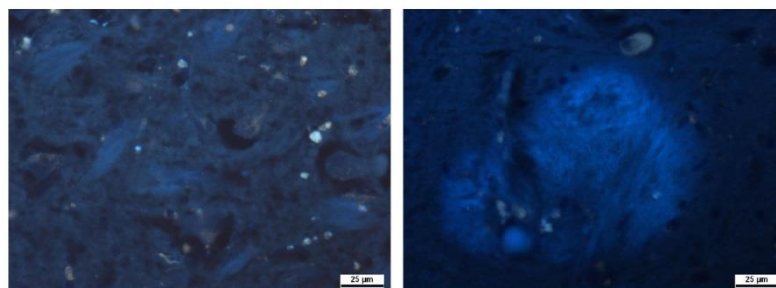
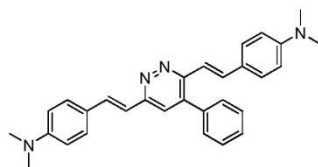
Tau fibrils (left) and A β -plaques (right) stained with **7e**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,4'-(1E,1'E,3E,3'E)-4,4'-(pyrimidine-4,6-diyl)bis(buta-1,3-diene-4,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline)
(**7f**)



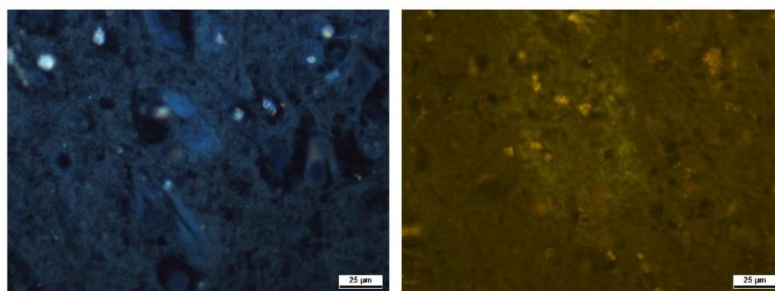
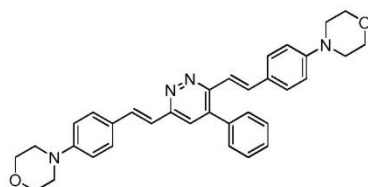
Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **7f**, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-phenylpyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (**8a**)



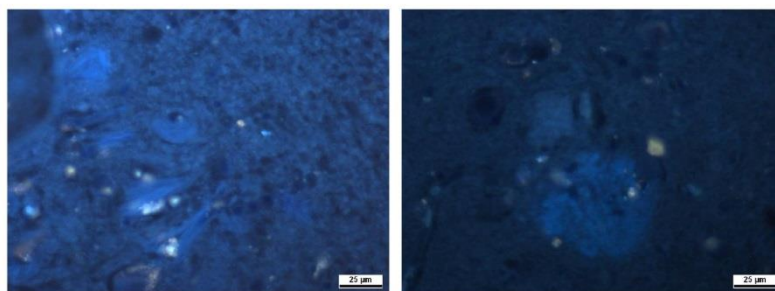
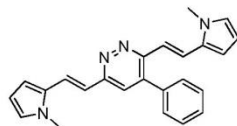
Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **8a**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,4'-(4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-phenylpyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(4,1-phenylene))dimorpholine (**8b**)



Tau fibrils (left, filter set 02 G365, FT395, LP420) and Aβ-plaques (right, filter set 09 BP450-490, FT510, LP515) stained with **8b**.

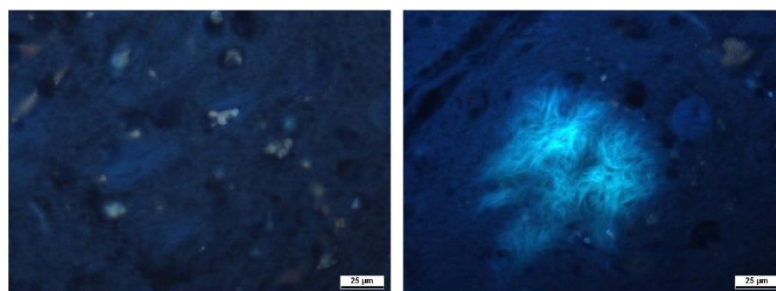
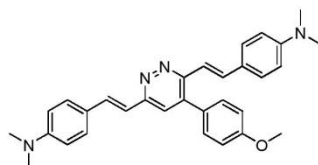
3,6-bis(4-(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)styryl)-4-phenylpyridazine (**8c**)



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **8c**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

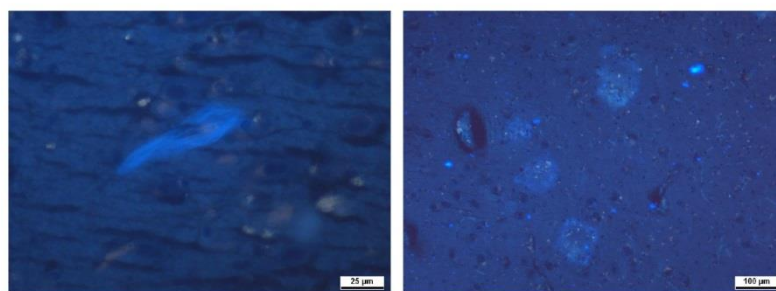
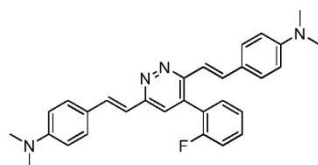
S10

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-(4-methoxyphenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (**8d**)



Tau fibrils fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **8d**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

4,4'-(1E,1'E)-2,2'-(4-(2-fluorophenyl)pyridazine-3,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl)bis(N,N-dimethylaniline) (**8e**)



Tau fibrils (left) and Aβ-plaques (right) stained with **8e**, filter set 02 G365, FT395, LP420.

S11

Thiazine Red Displacement Assay

Corresponding IC₅₀ values (inhibitory concentration for 50% decrease) were calculated using the Levenburg Marquardt algorithm:

The obtained values are the average values of duplicates of replicate experiments. The statistical presentation follows the guidelines laid out by G. Cumming, J. *Cell Biology*, **2007**, 177, 7-11.

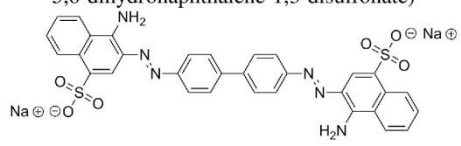
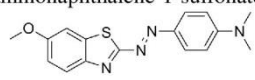
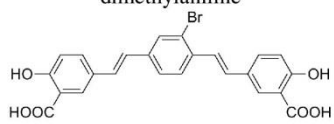
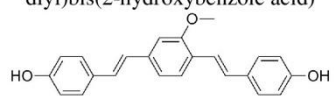
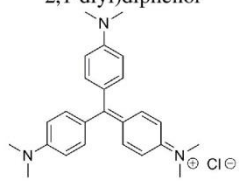
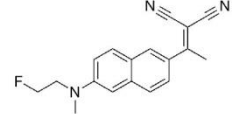
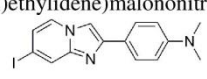
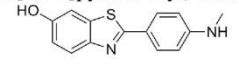
$$y = A + ((B-A)/(1+((C/x)^D)))$$

Item	Description
A	The bottom plateau of the curve corresponds to the final minimum y value.
B	The top of the plateau of the curve corresponds to the final maximum y value.
C	The IC ₅₀ value represents the x value at which the half maximum y value is attained.
D	The slope factor. In this model a positive value is returned when y increases with increasing x and a negative value when y increases as x is decreasing.
x	Concentration of the tested compound (nM)
y	Net fluorescence in % of controls.

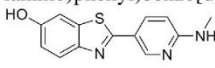
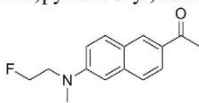
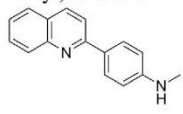
Table 1: Determination of IC₅₀ values for different compounds on aggregated proteins using the *thiazine red* assay. Data represent average of technical replicates.

compound		IC ₅₀ (nM) aggr. Tau	IC ₅₀ (nM) aggr. AB ₄₀
Evans Blue	<p>tetrasodium (6<i>E</i>,6'<i>E</i>)-6,6'-[(3,3'-dimethylbiphenyl-4,4'-</p>	1.0	89

S12

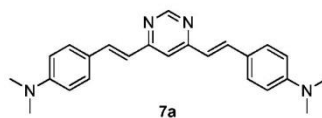
Congo Red	<p>diyl)di(1<i>E</i>)hydrazin-2-yl-1-ylidene]bis(4-amino-5-oxo-5,6-dihydronaphthalene-1,3-disulfonate)</p> 	5.4	14
Hondson 1d*	<p>sodium sodium 3,3'-([1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(4-aminonaphthalene-1-sulfonate)</p> 	8.8	13
BSB	<p>(<i>E</i>)-4-((6-methoxybenzo[d]thiazol-2-yl)diazenyl)-<i>N,N</i>-dimethylaniline</p> 	18	78
Methoxy-XO4	<p>5,5'-(1<i>E</i>,1'<i>E</i>)-2,2'-(2-bromo-1,4-phenylene)bis(ethene-2,1-diyl)bis(2-hydroxybenzoic acid)</p> 	246	140
Crystal Violet	<p>4,4'-(1<i>E</i>,1'<i>E</i>)-2,2'-(2-methoxy-1,4-phenylene)bis(ethene-2,1-diyl)diphenol</p> 	1545	1280
FDDNP	<p>tris(4-(dimethylamino)phenyl)methylmethyl chloride</p> 	1635	1467
IMPY	<p>2-(1-(6-((2-fluoroethyl)(methyl)amino)naphthalen-2-yl)ethylidene)malononitrile</p> 	2707	5671
PIB	<p>4-(7-iodoimidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)-<i>N,N</i>-dimethylaniline</p> 	3255	5190

S13

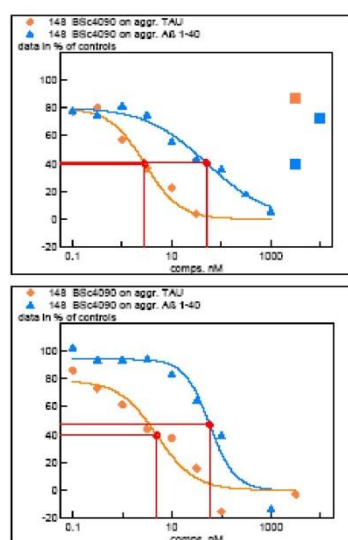
AZD2184	2-(4-(methylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-ol	9802	>10000
			
FENE	2-(6-(methylamino)pyridin-3-yl)benzo[d]thiazol-6-ol	>10000	>10000
			
BF-158	1-(6-((2-fluoroethyl)(methyl)amino)naphthalen-2-yl)ethanone	>10000	>10000
			
	N-methyl-4-(quinolin-2-yl)aniline		

* Compound Honson 1d from Honson et al, *Neurobiol Dis.* **2007**, 28(3), 251-60.

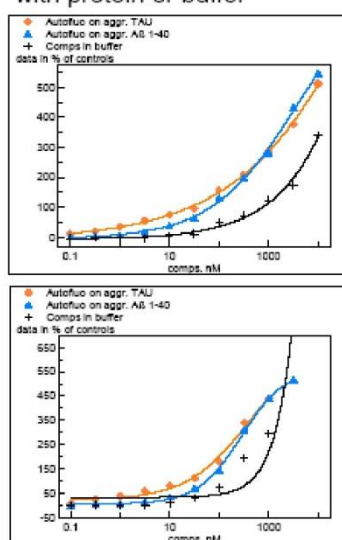
Examples of IC₅₀ determination for compounds **7a**, **7e**, **8b**.



ThiazineRed assay IC₅₀

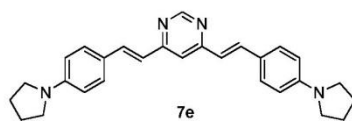


Compound Background with protein or buffer

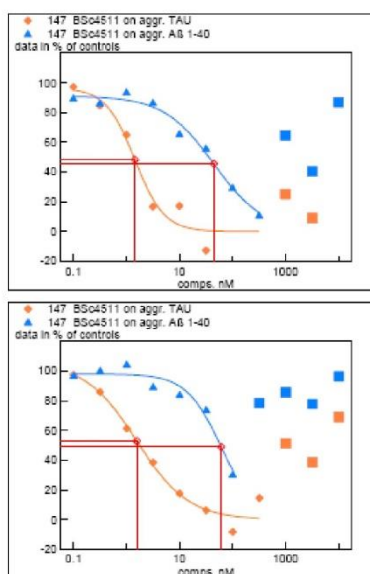


TAU	assay	IC ₅₀	slope	comment
BSc4090	TBA321nh	2.8	-1.2	ok - autofluo
BSc4090	TBA322nh	5	-1.1	ok - autofluo
Abeta	assay	IC ₅₀	slope	comment
BSc4090	TBA321nh	51	-0.7	ok - autofluo
BSc4090	TBA322nh	58	-1.7	ok - autofluo

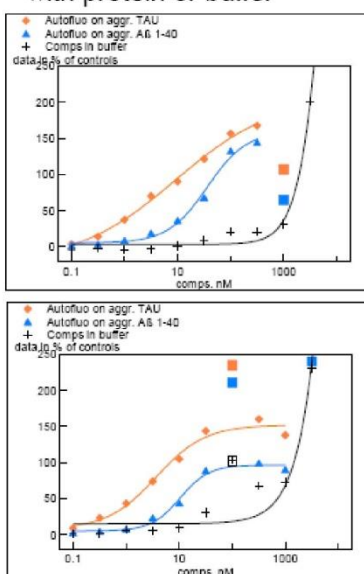
S15



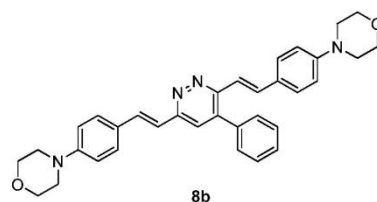
ThiazineRed assay IC50



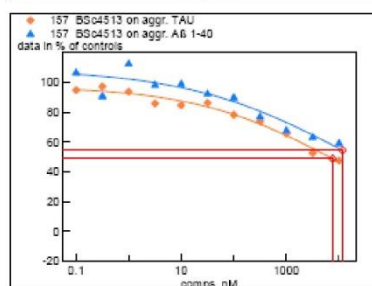
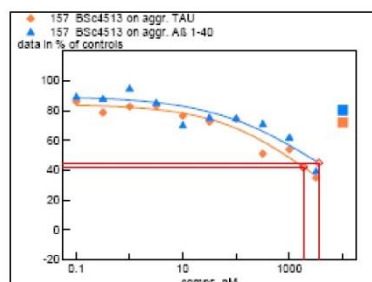
Compound Background with protein or buffer



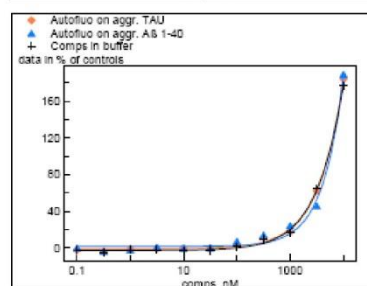
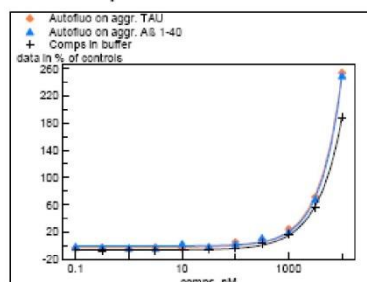
TAU	assay	IC50	slope	comment
BSc4511	TBA321nh	1.5	-1.6	ok
BSc4511	TBA322nh	1.6	-0.9	ok
Abeta	assay	IC50	slope	comment
BSc4511	TBA321nh	44	-0.9	ok
BSc4511	TBA322nh	61	-1.3	ok



ThiazineRed assay IC50



Compound Background with protein or buffer



TAU	assay	IC50	slope	comment
BSc4513	TBA321nh	1831	-0.5	ok
BSc4513	TBA322nh	7583	-0.3	ok
Abeta	assay	IC50	slope	comment
BSc4513	TBA321nh	3545	-0.4	ok
BSc4513	TBA322nh	11637	-0.3	ok

S17

Correlation of Affinities to Physicochemical Parameters

The plotted values for compounds **6c**, **6e**, **6f**, **7a**, **7c-f**, **8b**, **8d** and **8e** are listed in table 1 of the paper.

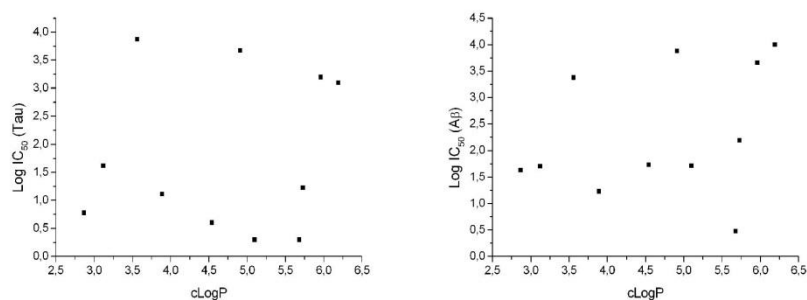


Figure 3: $\log IC_{50}$ values plotted against $cLogP$ values (left:tau, right: $A\beta$)

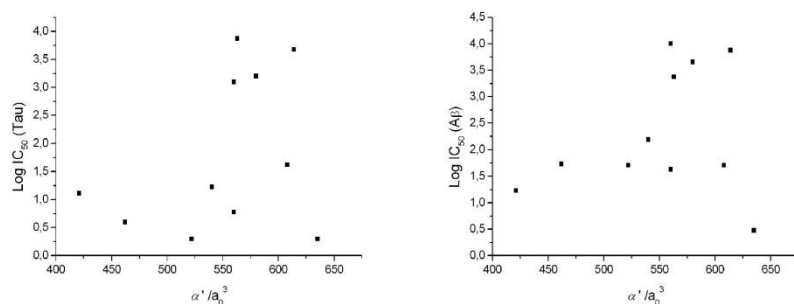
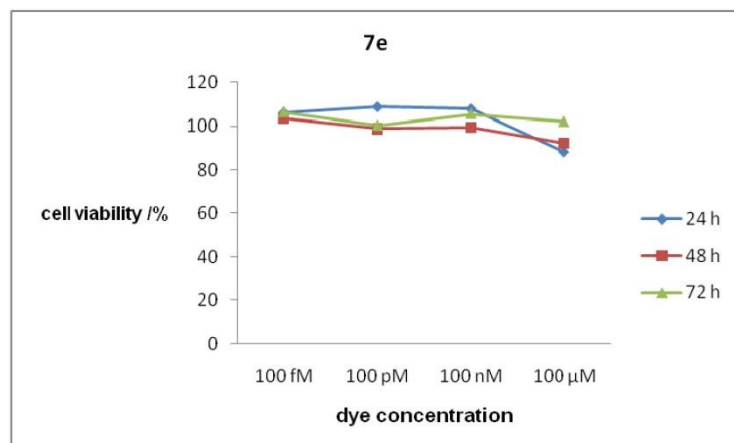
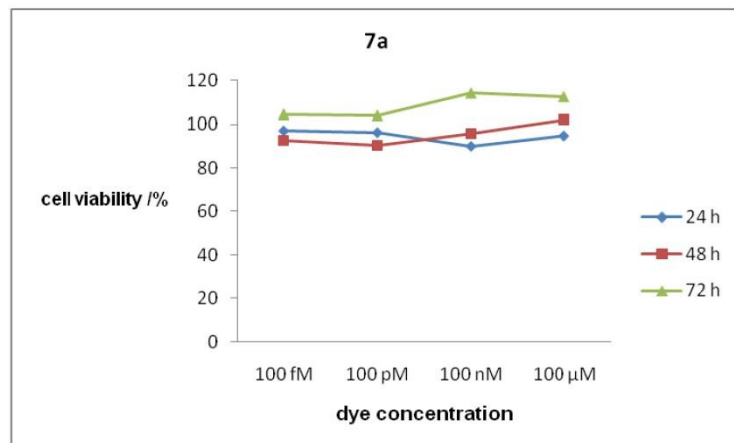


Figure 4: $\log IC_{50}$ values plotted against static electronic polarizabilities α' (a_0^3) (left: tau, right: $A\beta$)

Toxicological Evaluation of 7a and 7e



Cell Culture

Liver hepatocellular carcinoma cells HepG2 were maintained in DMEM/F12 1+1 supplemented with 10 % fetal bovine serum. Cells were cultivated under sterile conditions in a humidified incubator (37 °C, 5% CO₂, 95% humidity) without antibiotics. Mycoplasma contamination could be excluded via routine examinations (PCR).

S19

Cell Proliferation Assay

To determine the number of viable cells after dye incubation, the CellTiter 96®AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA) was used. Briefly, HepG2 cells were seeded in 96-well plates at a density of 18.000 cells per cm². 24 hours later, cells were incubated with 100 fM, 100 pM, 100 nM or 100 µM of **7a** or **7e** for 24, 48, 72 hours. Afterwards, cells were washed three times with PBS and CellTiter 96®AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Reagent was added to the samples. The colorimetric assay is based on the reduction of a tetrazolium salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] into a formazan product by intrinsic dehydrogenases of living cells. The amount of formazan product correlates directly to the number of metabolically active cells, and it was calculated after photometric analysis at $\lambda=492$ nm using a microplate reader (Tecan, Crailsheim, Germany). To quantify cell viability, absorbances of treated samples were normalized to untreated controls (percentage of nontreated controls), which resulted in cell viability. Thereby cell viability values between 70% and 120 % represent neither cytotoxic nor proliferative effects on HepG2 and loss of cell viability over 30% characterizes a substance as cytotoxic, according to DIN ISO 10993-5:2009.

In Vivo Imaging

Animal Models

Double transgenic mice harbouring the APP_{swe} and PS1_{ΔE9} mutation (B6.Cg-Tg(APP_{swe},PSEN1dE9)85Dbo/Mmjax, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were crossed to YFP-H mice (Feng et al. 2000; B6.Cg-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). APP_{swe}PS1_{ΔE9} mice develop severe plaque pathology from 6 month of age. Mice were group housed under pathogen-free conditions until surgery, after which they were singly housed. All procedures were in accordance with an animal protocol

S20

approved by the University of Munich and the government of upper Bavaria (Az. 55.2-1-54-2531-188-09).

Cranial Window Surgery

For *in vivo* imaging, a chronic cranial window was prepared as described previously (Fuhrmann et al. 2007; Holtmaat et al. 2009).

The mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (0.14/0.01 mg/g body weight; WDT/Bayer Health Care, Garbsen/Leverkusen, Germany). Additionally, dexamethasone (6 µg/g body weight; Sigma) was intraperitoneally administered immediately before surgery. Utilizing the open skull preparation, a cranial window was placed above the somatosensory cortex. For repositioning during repetitive imaging a small metal bar, containing a hole for a screw, was glued next to the window. After surgery, mice received subcutaneous analgesic treatment with carprofen (7.5 µg/g body weight; Pfizer, New York, NY, USA) and antibiotic treatment with cefotaxim (0.25 mg/g body weight; Pharmore, Ibbenbüren, Germany).

Dye Application and Two-Photon *in vivo* Imaging

Two-photon imaging began after a 3 week recovery period post-surgery utilizing a LSM7MP setup (Zeiss) equipped with a MaiTai DeepSee laser (Spectra Physics). Images were obtained using 20x water immersion objectives (1,0 NA, Zeiss) with less than 50 mW laser power to avoid phototoxicity. For plaque staining, 2 mg/kg of the marker (dissolved in 10% DMSO, 45% PBS and 45% 1,2-propanediol) were intraperitoneally injected 4h before the imaging sessions. For examination, mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine. Two-photon excitation was performed at 880 nm for **7a** (emission BP 575-640) and YFP (BP 500-550), and **5** was excited with 750 nm (BP 435-485 nm).

Computational Methods

All quantum calculations were performed with Turbomole 6.3.1.^{1, 2, 3, 4} Equilibrium structures of the various compounds in their electronic ground state were determined within density functional theory (DFT) with the hybrid b3-lyp density functional,^{5, 6, 7} and the basis set def2-TZVP⁸ (triple zeta quality with polarisation functions).

Multiple grid techniques (m4 grid) were used in the numerical integration steps required for the determination of the exchange-correlation contribution and the resolution of the identity (RI) approximation was employed together with the corresponding RI basis set for the description of the two-electron Coulomb contribution (RI-J). Convergence criterion in the self-consistent field (SCF) calculations was typically an absolute value for the energy change to remain in two subsequent SCF cycles well below 1 μE_h (microHartree), in some cases below 1 n E_h . All energy-optimized structures were confirmed to correspond to local minima on the Born-Oppenheimer potential energy hypersurface by computation of the harmonic vibrational wavenumbers via analytical second derivatives of the energy with respect to displacements of the nuclei. Vertical electronic singlet excitation energies and corresponding electronic transition dipole moments at the equilibrium structure of the electronic ground state were obtained in the framework of TDDFT within the random phase approximation for the molecules in the gas phase. The same basis set as before was employed, but the RI approximation was not used in these calculations. Solvent effects were not accounted for. Nevertheless the comparison between computed and measured values of the singlet excitation energies of longest wavelength were considered as a gauge for the quality of the underlying quantum chemical description of the electronic structure. Electric static isotropic electronic polarizabilities α and their anisotropies were computed for the molecule in the gas phase within time-dependent density functional theory (TDDFT) with the same basis set (but without invoking the RI approximation). The computed isotropic values are reported as polarizability volumes $\alpha' = \alpha/(4 \pi \epsilon_0)$ in units of the Bohr radius cubed (a_0^3).

- 1 TURBOMOLE V6.3.1 2011, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989-2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007; available from <http://www.turbomole.com>.
- 2 R.Ahlrich, M.Baer, M.Haeser, H.Horn, C.Koelmel. *Chem.Phys.Lett.* 162: 165 (1989)
- 3 O.Treutler and R.Ahlrichs *J. Chem. Phys.* 102: 346 (1995)
- 4 M.v.Arnim and R. Ahlrich *J.comp.Chem.* 19: 1746 (1998)
- 5 A.D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 5648.
- 6 S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.*, 1980, **53**, 1200.
- 7 R.H. Hertwig, W. Koch, *Chem. Phys. Lett.*, 1997, **268**, 345.
- 8 F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**(18), 3297–3305.

Table 2: Cartesian components of the static electronic polarizability tensor reported as $\alpha' = \alpha_{ab}/(4\pi\epsilon_0)$ in units of a_0^3 with a,b being elements of {x,y,z}. Only the upper triangular part is reported in the order $\alpha'_{xx}, \alpha'_{xy}, \alpha'_{xz}, \alpha'_{yy}, \alpha'_{yz}, \alpha'_{zz}$ "

molecule			
6a	262.4982704108177	69.00677045140949 294.2900113617149	-44.33218258692747 -267.8347915425095 963.7249543045604
6b	225.9494456405219	10.71360146212114 732.7211957323925	8.311362416549132 4.051667788438842 127.7983384533197
6c	810.1382440635023	22.80803355918915 147.9021320085703	-177.9406778413931 -0.2528967549393659 304.3277473645971
6d	276.6581875103774	37.00863779449766 210.5302434366262	-85.57858747173205 -5.778976630584233 877.7718625816733
6e	338.3776370336508	-0.001590035860855782 219.1438019134773	-100.5422670750512 0.001749591087893206 1123.108946736544
6f	1028.528016669583	245.2956821874811 -2.376573237499612	-365.8005210498284 -8.008897763840713 549.1169139372016
6g	347.2382189028332	0.09417006545604528 233.2267085026278	-97.04599540445625 2.139024770686586 1173.677357835677
6h	362.9956644342415	-8.234163123899293 214.5679778579173	-202.8755064578807 -52.98259360080004 1126.417682915112
7a	897.5801039781438	-35.40112222056501 172.7698456416408	-0.008146052552323813 0.003314588141119013 316.6300524018481
7b	973.5272870174524	-47.98689444128011 216.5436314865494	0.006775023380949208 0.01460922348211651 361.8480504910972
7c	1050.303314352402	-60.21836551784305 246.1212918350798	0.01433388837446656 -0.01028524609585979 393.2871963731071
7d	1011.685271594847	-57.03573250802267 231.5593640564014	-0.002375777685746594 -0.001060092086346748 375.5621155113077
7e	411.8120836909569	-104.0899960102595 473.3341752064377	-302.0573840625522 247.6305858910980 681.3269214917525
7f	1349.389573696845	25.32643743681051 360.0481804452535	0.9069229789798813 -0.4604411237489425 195.0510634072083
8a	790.3283442057852	-19.93132279599062 234.6074499299077	-318.0399370713891 33.57825112763442 650.5704317761166
8b	869.5673729345548	-30.99928665565317 277.7218664523716	-330.6858560296066 34.31078928820821 693.8829458771067
8c	588.2056507071935	-190.9029386308541	60.27793157727974

S23



		464.2329868044077	-60.75739316391270 204.1849945751337
8d	788.2110453087106	-23.42352449166784 247.0292111142860	-303.4775703374345 27.08358803798068 705.3790513476227
8e	793.1406156050651	-21.81806196717561 235.7363313157532	-322.2746514257645 31.36914614917355 652.4555452239658

S24

3.6 **Synthese und physikochemische Evaluation substituierter Benzotriazol-Derivate als fluoreszente Marker neurofibrillärer Bündel**

Der Inhalt dieses Kapitels wird 2014 zur Veröffentlichung eingereicht.

Jiamin Gu, Upendra Rao Anumala, Stefan Göring, Constantin Voss, Silvia Bauer, Roland Heyny von Haußen, Gerhard Mall, Heiner Detert, Robert Berger, Boris Schmidt, “Fluorescent N-2-substituted-1,2,3-triazoles as imaging agents for neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain and the olfactory epithelium”.

Die Synthese substituierter Benzotriazole hat zu hoch fluoreszenten und Tau/A β -selektiven Markern geführt. Im Gegensatz der zuvor beschriebenen Publikation, liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Vorhersage und Messung physikochemischer Parameter dieser Substanzklasse. Während Absorptions- und Emissionsmaxima sowohl quantenchemisch berechnet, als auch experimentell in Lösung gemessen wurden, ermöglichte der Einsatz multispektraler Mikroskopie eindrucksvolle Aufnahmen fluoreszent markierter Tau-Fibrillen und A β -Plaques an menschlichem Hirngewebe. Die spektral aufgelöste Detektion des emittierten Lichts konnte nachträglich durch spezielle Software prozessiert werden, sodass positive Färbungen deutlich vom Hintergrund differenziert wurden. Wird eine deutlich identifizierbare pathogene Struktur (bsp. Tau-Fibrille oder A β -Plaque) einer Probe manuell markiert, so erkennt die Software weitere Strukturen des gleichen Emissionsspektrums automatisch, sodass „falsch positive Ergebnisse“ der Datenanalyse durch Artefakte oder Fehlinterpretationen reduziert werden. Zudem beinhaltet die Arbeit bereits beschriebene histologische Untersuchungen an Bowman-Drüsen der Riechschleimhaut von Alzheimer Demenz Patienten und einen toxikologischen Ansatz am Zebrafisch Embryonen Modell.

Beitrag C. Voss: Histochemische Färbung an menschlichem Hirngewebe mit **1a-g**, Fluoreszenzmikroskopie, Daten-Prozessierung und Datenanalyse anhand des „Nuance FX Multispectral Tissue Imaging Systems“ (Nummern wie in Publikation).

Fluorescent imaging

Fluorescent *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles as imaging agents for neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain and the olfactory epithelium

Jiamin Gu,^[a] Upendra Rao Anumala,^[a] Stefan Göring,^[a] Constantin Voss,^[a] Silvia Bauer,^[a] Roland Heyny von Haußen,^[b] Gerhard Mall,^[b] Heiner Detert,^[c] Robert Berger^[a] and Boris Schmidt^{*[a]}

Abstract: We evaluated *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles (**1a-g**) as effective probes for the imaging of tau aggregates in human AD brain and olfactory epithelium sections. These probes display suitable physical chemistry characteristics and

provide significantly higher quantum yields in non-aqueous environment but low quantum yields in polar solvents. Evaluation of the cytotoxicity of via the zebrafish embryos development assay showed negligible cytotoxicity *in vivo*.

Dedication ((optional))

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common forms of dementia affecting millions of elderly people, it affects memory, thinking, behaviour, the ability to perform everyday activities and eventually disturbs reasoning, planning, language, vision and perception.^[1] It was estimated that 36 million people were affected by AD and other dementias in 2011, this number is predicted to rise to 66 million by 2030 and 115 million by 2050.^[2] Post-mortem analysis of human brains provided insight into disease mechanism and potential interventions. A century ago, Alois Alzheimer described the two hallmark abnormal proteins in patients' brains: senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles

(NFTs). Although the ultimate causes of AD are not fully understood yet, it is generally acknowledged that the formation of SPs and NFTs are hallmark events in the progress of AD. SPs are composed of the β -amyloid (A β) peptide, a fragment of the amyloid precursor protein (APP), whereas the NFTs are comprised of the hyperphosphorylated microtubule-associated protein tau.^[3]

The imaging of pathological changes in the brain may facilitate the early diagnosis of AD, particularly in presymptomatic stages.^[4] The intravenous administration of radiolabeled probes that selectively bind to either A β plaques or NFTs is in advanced development to visualize the pathology by positron emission tomography (PET) or single photon emission computed tomography (SPECT). Over the past decade, several probes have been reported for A β imaging.^[5] Few of them are already evaluated in clinical trials in humans. In April 2012, Flortbetapir (Amyvid®) a ¹⁸F-labeled PET probe was approved by the U.S. FDA for the imaging of A β plaques in adult AD patients of AD to exclude other causes of cognitive decline.^[6] Although imaging of A β plaques provides information of plaque density and total amyloid deposition, it does not adequately correlate with disease progression. There are both false imaging positives (healthy) and

[a] Dr. J. Gu, U. R. Anumala, S. Göring, C. Voss, S. Bauer, Prof. Dr. R. Berger, Prof. Dr. B. Schmidt
Clemens Schöpf-Institute of Chemistry and Biochemistry
Technische Universität Darmstadt
Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt (Germany)
Fax: (+49) 6151-163278
E-mail: schmidt_boris@t-online.de

[b] Dr. R. Heyny-von Haußen, Dr. G. Mall
Institute of Pathology
Klinikum Darmstadt
Grafenstrasse 9, 64283 Darmstadt (Germany)

[c] Prof. Dr. Heiner Detert
Institut für Organische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität
Duesbergweg 10-14, 55128 Mainz (Germany)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chemmedchem.org> or from the author. ((Please delete if not appropriate))

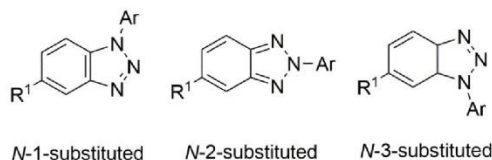


Figure 1 The isomers of *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles.

false imaging negatives (AD positive/PET scan negative). Recent findings indicate that the correlation of tau deposition and AD progression may provide a more reliable biomarker for AD. However, only few probes have been reported to visualize NFTs: benzimidazoles,^[7] quinolines^[7-8], stilben^[7] and cyanine derivatives^[4, 9] T807 is a tau selective PET imaging agent which is highly selective to NFTs over SPs and currently in clinical trials.^[10] However, some of these probes display limited fluorescence, which may allow to image tau deposition *in vitro* by post mortem autopsy or in accessible tissues such as the retina or the olfactory epithelium.

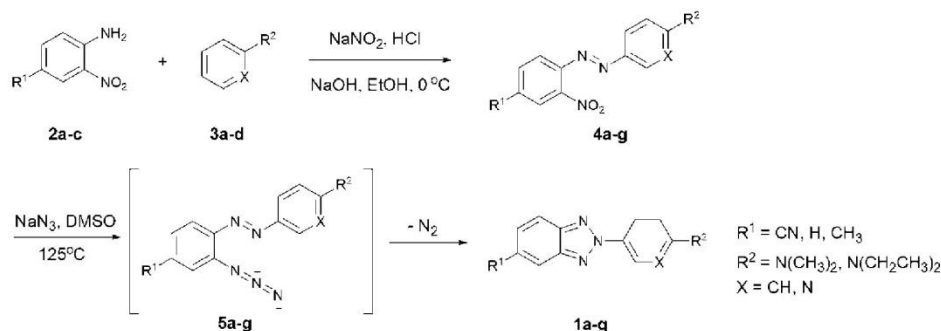
Fluorescence imaging provides real time non-radioactive *in vivo* imaging and avoids the obstacles of radioactive isotopes. Yet, it is frequently rejected to be a non-viable modality in humans as it requires higher concentration of the probe in comparison to PET probes and is severely limited by autofluorescence of the tissue and thus limited in depth. However, the investigation of the human retina or the human olfactory system by retina scanning or endoscopic devices may provide access to non-invasive imaging of AD.^[4] The presence of hyperphosphorylated tau was reported for the retina of P301S transgenic mice and the human retina. Thus, there is a need for fluorescent tau selective imaging agents and suitable optical devices, which in combination may provide a fundamentally different system for AD diagnosis.

1,2,3-Triazoles, as important heterocycles in chemistry and biology, have come to the forefront as compounds of which import a large number of applications. A new class of UV/blue-light-emitting fluorophores, the *N*-2-aryl-1,2,3-triazoles may provide tuneable emission and flexible Stokes shift via a planar intramolecular charge transfer.^[11] The three triazole isomers (Figure 1) are intensely coloured, indicating strong absorption.

However, strong fluorescence was observed for the *N*-2-aryl-1,2,3-triazoles only, which showed excellent fluorescence emission in the UV/blue range with high efficiency in different solvents.^[12] The *N*-2-aryl-triazoles display more than 17-fold higher fluorescence intensity than their *N*-1-aryl isomers. The *N*-2-aryl group of *N*-2-aryl-1,2,3-triazoles avoids the *ortho*-steric repulsion associated with typical bis-aromatic systems and engages in good conjugation with the benzotriazole. Thus is it characterized by a smaller dihedral angle in the ground state. The changes in the dihedral angle of the structurally related thioflavin T are important for the enhanced fluorescence upon binding to amyloid and tau aggregates.

Results and Discussion

For these reasons, the *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles (**1a-g**) were selected and evaluated as fluorescent imaging probes in AD brain tissue and the fundamental properties of these species are described.^[12b] The impact of *N,N*-dimethylamino and *N,N*-diethylamino substituents on the selective imaging of tau aggregates has been reported previously.^[4, 9] In the present work, a novel push-pull chromophore comprising a dimethylamino electron-donor and an electron-withdrawing group (CN) at the 5-position of the benzotriazole (**1a**) has been synthesized. In addition, we have prepared four *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles equipped with donor groups (*N,N*-dimethylamino or *N,N*-diethylamino) in the 2-position of aromatic ring and hydrogen or methyl in the 5-position to serve as controls (**1b-g**) in the staining of tau aggregates in the human AD brain.



Scheme 1 Synthesis of *N*-2-substituted-1,2,3-triazole derivatives (**1a-g**).

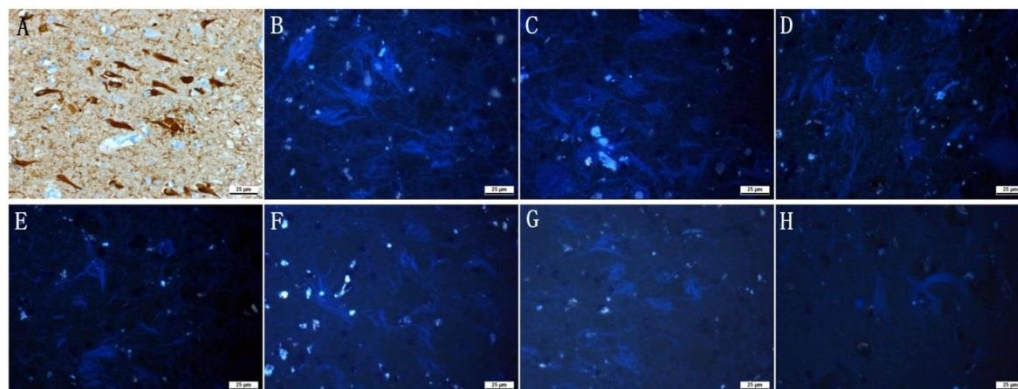


Figure 2 Neuropathological staining of hippocampal brain sections of an AD patient (A–H). Immunohistochemical staining of hippocampal sections: NFTs with antibody AT8 mAb (A). Probes **1a** (B), **1b** (C), **1c** (D), **1d** (E), **1e** (F), **1f** (G) and **1g** (H) are clearly stained neurofibrillary tangles (Tissues: hippocampus; Patient: male, 71 years old, CERAD-Score: 3, NFTs-level: V). Filter set 15 (A) and filter set 02 (B–H) were used for fluorescence microscopy.

A reported transition metal free synthesis of *N*-2-aryl-1,2,3-triazole derivatives was adopted to prepare the *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles.^[17] The process involved diazotization of 4-substituted-2-nitroanilines **2a–c** with sodium nitrite in hydrochloride solution to form the diazonium salts. This diazonium salts were coupled with a molar equivalent of *N,N*-dimethylaniline or *N,N*-diethylaniline at 0–5 °C to result in the desired intermediates. The reactions proceeded immediately with a change in color from pale yellow to deep brown to afford the corresponding azo compounds **4a–g**. The reaction of the azo compounds with sodium azide provided the organic azide intermediates **5a–g**, which immediately released nitrogen to afford the desired *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles **1a–g** (Scheme 1). All compounds were purified by column chromatography and characterized by NMR spectroscopy.

The *N,N*-dimethylamino donor group in the 4-position of the 2-aryl ring in probes **1b** was replaced by a *N,N*-diethylamino group in **1c** (Table 1). However, this exchange did not result in significantly improved absorption and the absorption spectrum of **1c** is only slightly redshifted in comparison to **1b**. The same trend was observed between the probes **1d** and **1e**. On the other hand, the introduction of the electron-withdrawing cyano group in the 5-position of benzotriazole lead to probe **1a**, which is characterized by higher absorption maxima in comparison to the spectra of the

probes **1b** and **1d**. The highly electron-withdrawing benzotriazole core connects with the terminal donor group to result in a highly fluorescent push-pull system. The push-pull character leads to delocalized π -electrons which drives compound polarizability. Such enhanced polarizability was suggested to contribute to selective tau binding.^[13] The spectra of the *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles are characterized by a broad excitation range and a remarkable Stokes shift (up to 150 nm) in acetonitrile. These Stokes shifts may facilitate the diagnostic differentiation from autofluorescent proteins such as human ocular lipofuscin (HOL), which are ubiquitous in the human tissue affected by neurodegenerative diseases such as AD and can be excited by the same wavelength yet display different Stokes shifts (HOL: Stokes shift = 60 nm, $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 365$ nm).

Small molecular probes with low molecular weight and appropriate lipophilicity may display sufficient permeability to cross the blood–brain barrier (BBB). Furthermore such probes mandate rapid distribution and rapid clearance from the body to be employed as *in vivo* imaging agents.^[4, 15] The molecular weights and calculated log*P* (clog*P*) values of probes are summarized in Table 1. The molecular weights are well below 300 Daltons and the clog*P* values of all these *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles were found to be in the range of 2.22 and 3.91. The *N,N*-diethylamino group was introduced as substituent on the

Table 1. Structures, properties of *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles **1a–e**

Compound	R ¹	R ²	X	MW ^[a]	cLog <i>P</i> ^[b]	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm) ^[c]	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm) ^[c]	Stokes Shift (nm) ^[c]	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm) (Calculated)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm) (Calculated)	α' (α_0) ^[d]	Dihedral angle ^[d]
1a	CN	N(CH ₃) ₂	CH	263.3	2.46	391	541	150	Robert Berger	
1b	H	N(CH ₃) ₂	CH	238.3	2.73	360	495	135				
1c	H	N(CH ₃ CH ₂) ₂	CH	266.3	3.48	369	495	126				
1d	CH ₃	N(CH ₃) ₂	CH	252.3	3.16	359	492	133				
1e	CH ₃	N(CH ₃ CH ₂) ₂	CH	280.4	3.91	367	490	123				
1f	H	N(CH ₃) ₂	N	239.3	2.22	351	450	99				
1g	CH ₃	N(CH ₃) ₂	N	253.3	2.64	350	450	100				

[a] Determined by CS ChemOffice 10.0. [b] Log*P* values were calculated using the Molinspiration Cheminformatics software (V2011. 04). [c] Measured in acetonitrile. [d] The calculated dihedral angle between *N*-2-aryl groups and the benzotriazole.

nitrogen atom of 2-aryl ring for two of the dyes (**1c** and **1e**). It is found that the *clogP* values of these probes were increased in comparison to the *N,N*-dimethylamino derivatives (**1b** and **1d**). The replacement of the aromatic ring of **1b** and **1d** with pyridines (**1f-g**) has been shown to decrease *clogP* values. The introduction of the cyano group in the 5-position of benzotriazole (**1a**) decreased the *clogP* value even further to 2.46. All of these uncharged probes are in the range of accepted *clogP* criteria for BBB permeation and thus were evaluated for the staining of AD associated protein deposits in post mortem tissue.

The histochemical staining was carried out on hippocampal sections from pathologically confirmed post-mortem, formalin fixated AD brain sections (Figure 2). In addition, we carried out an immunohistochemical staining of neighbouring human AD brain sections to confirm that these tissues contain high level of NFTs. The tissues were stained with *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles **1a-g** and the binding was visualized by fluorescence microscopy. All probes **1a-g** stained NFTs at good contrast versus background.^[4] These results indicated that *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles may be used as potential imaging agents for the tau pathology in AD.

The aminopyridyl series was inspired by Astra Zeneca's amyloid ligand AZD2184 which offers improved pharmacokinetics over the lead compound PIB.^[16] The aminopyridyl series is characterized by interesting *clogP* and tPSA descriptors, yet these aminopyridyls display inferior fluorescence properties in comparison to the aniline series. Thus they were omitted from further evaluation for fluorescence based applications, yet they may be exploited in PET imaging of amyloid deposits.

It was reported that the Tau-fibrils and A β plaques in the brain sections were stained just weakly as observed by fluorescence microscopy, which may be either due to weak affinity or due to interference with the fluorescence properties upon binding to the targets. The fluorescence reduction or changes in the Stokes shift may limit the detection of A β plaques or NFTs by fluorescence microscopy using filter sets 09 and 15.^[4] A challenging problem in the detection of target in brain tissue is the fluorophore in paraffin-embedded tissue sections that demonstrate the typical high levels autofluorescence. However, an image captured by the Nuance multispectral imaging setup can be processed with its specialized software. Regions of interest may be marked manually and the software will recognize all areas with the same emission and highlights them in the colour of choice. It may provide perfect contrast to the background. In this work, the Nuance setup was used as a tool to evaluate staining effect of *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles. It is found that the hallmarks which stained by probes **1a**, **1b** and **1d** may be

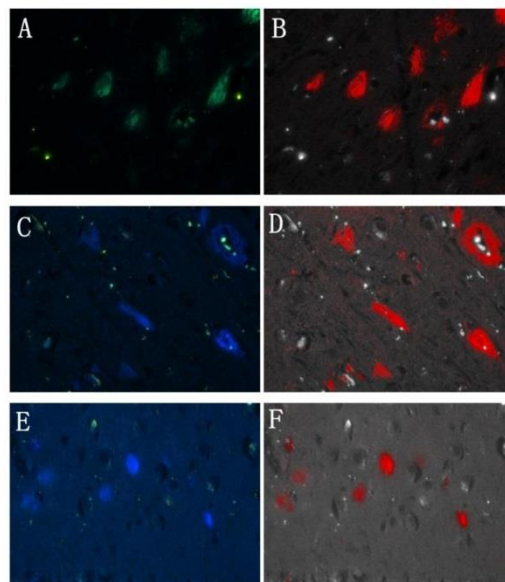


Figure 3 Neuropathological staining of hippocampal brain sections of an AD patient (A, C and E) and imaging processed with the Nuance software. (Tissues: hippocampus; Patient: male, 80 years old, CERAD-Score: 3, NFTs-level: V-VI).

recognized by the Nuance software clearly and highlighted with red colour and a neutral background (Figure 3). It may provide significant differentiation from the background and the stained Tau-fibrils or A β plaques can be highlighted attractively.

We have previously demonstrated the staining of amyloid and tau deposits by functionalized bis-styrylbenzenes.^[14] However, these fluorescent dyes are characterized by moderate quantum yields. Thus we were interested to explore scaffolds that provide significantly higher quantum yields in non-aqueous environment. The fluorescence observed in non-polar solvents such as hexane or toluene may resemble the fluorescence of the bound fluorophore in protein deposits. Moreover, these fluorophores should display low quantum yields in polar solvents, such as water (Table 2). This strong solvent dependent fluorescence may give rise to an improved signal-to-noise ratio.

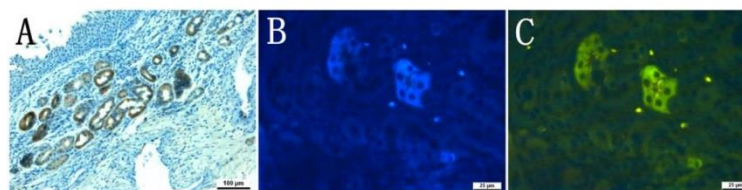


Figure 4 Immunohistological staining of Bowman's glands of the olfactory epithelium containing tau aggregates (Patient: male, 78 years old, Braak: V, CERAD-Score: 3) with antibody TAU Ab-3 (A). Histochemical staining of Bowman's glands of the olfactory epithelium containing tau aggregates extracted from a deceased AD patient. Filter set 09 (B) and filter set 09 (C) were used for fluorescence microscopy. All compounds were used at 1 mM concentration for the histological experiments.

Table 2. Physical properties of *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles **1a-g** in a series of solvents

	Compound	Cyclohexane	Toluene	Dichloromethane	Acetonitrile	Ethanol	Methanol	Methanol/Water	Water
Abs _{max} (nm)	1a	387	392	397	391	394	388	360	358
	1b	352	362	364	360	360	360	N.D.	N.D.
	1c	366	370	372	369	369	369	N.D.	N.D.
	1d	351	360	362	359	359	358	N.D.	N.D.
	1e	365	368	369	367	367	366	N.D.	N.D.
	1f	354	355	353	351	350	344	346	343
	1g	346	355	353	350	350	348	348	338
Extinction	1a	0.653	0.643	0.572	0.566	0.576	0.648	0.274	0.200
	1b	0.526	0.529	0.491	0.509	0.502	0.496	N.D.	N.D.
	1c	1.48	1.46	1.23	1.43	1.37	1.40	N.D.	N.D.
	1d	0.751	0.723	0.721	0.697	0.705	0.680	N.D.	N.D.
	1e	0.375	0.324	0.337	0.345	0.335	0.338	N.D.	N.D.
	1f	0.429	0.433	0.408	0.413	0.424	0.423	0.190	0.338
	1g	1.13	1.09	1.04	1.14	1.10	1.11	0.586	0.374
Extinction coefficient (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	1a	29644	29176	25967	25672	26148	29416	12439	9079
	1b	25271	25415	23590	24440	24099	23830	N.D.	N.D.
	1c	36884	36435	30696	35687	34189	34913	N.D.	N.D.
	1d	31580	30402	30318	29309	29645	28594	N.D.	N.D.
	1e	23364	20186	20997	21495	20872	21059	N.D.	N.D.
	1f	23330	23526	22166	22454	23047	23005	10333	18381
	1g	25825	24855	23842	26106	25147	25398	13372	8535
Fluo _{max} (nm)	1a	442	472	502	525	519	486	563	396
	1b	411	438	463	484	489	496	N.D.	N.D.
	1c	484	441	468	483	489	494	N.D.	N.D.
	1d	410	437	459	479	485	496	N.D.	N.D.
	1e	415	439	463	481	486	496	N.D.	N.D.
	1f	401	423	440	456	460	466	470	N.D.
	1g	400	422	436	453	458	461	443	400
Quantum Yields	1a	0.73	0.62	0.57	0.19	0.07	0.05	0.05	0.05
	1b	0.97	0.73	0.48	0.41	0.11	0.03	N.D.	N.D.
	1c	0.93	0.83	0.30	0.25	0.16	0.08	N.D.	N.D.
	1d	0.92	0.80	0.58	0.50	0.16	0.04	N.D.	N.D.
	1e	0.85	0.70	0.58	0.48	0.22	0.07	N.D.	N.D.
	1f	0.83	0.94	0.62	0.69	0.44	0.20	0.09	0.02
	1g	0.97	0.75	0.67	0.77	0.42	0.25	0.16	0.03

N.D. Not determined

We reported previously that the AD associated tau-protein may deposit in nasal mucous membranes, particularly in the nasal Bowman's glands of the olfactory epithelium.^{14, 14, 17} The degree of tau accumulation in the Bowman's glands was observed to correlate with AD progression in the brain as staged by NIA Reagan criteria, which may be utilized as non-invasive tool for the diagnosis of early stages of AD. Probe **1c** was selected as an example to detect tau deposits in the olfactory epithelium tissues *in vitro*. It was found that tau deposits were clearly stained by probe **1c** as seen in the histochemical assay. The tau deposits were observed by fluorescence microscopy using filter sets 02 and 09 (Figure 4). These results suggested that *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles may be applied as efficacious fluorescent probes for the detection of tau deposits in olfactory epithelium tissue.

The inclusion of cytotoxicity studies eliminates potentially unsafe compounds early in the development process and prioritizes compounds for further preclinical and clinical studies. In

the present study, we used zebrafish (*Danio rerio*) embryos as model to evaluate the cytotoxicity of candidate probes. The zebrafish is a classical tractable vertebrate and embryological model for human diseases. The small size, high fecundity, rapid external development, optical transparency during early embryogenesis and genetic similarity to humans are favourable features for biomedical and behavioural genetics studies.^{4, 9, 18} The compounds **1c-d** have been evaluated at different concentrations in the wild-type zebrafish embryo development assay. The embryos were treated with solutions containing the compounds at 6-8 hours post-fertilization (hpf), and the phenotypes were compared at 24 hpf and 72 hpf. It was observed that the embryos developed well and did not display any lesions in eye, yolk, tail and heart beat at different concentrations up to 10 μ M (Figure 5). The cytotoxicity evaluation suggests that *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles have negligible cytotoxicity against wild-type zebrafish embryos at the concentration employed for the histology experiments on human AD brain tissue (1 μ M).

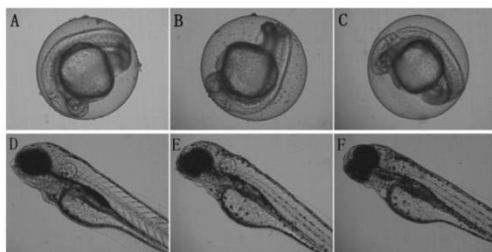


Figure 5 *In vivo* cytotoxicity studies with embryos of zebrafish after 24 (A–E) hpf and 72 hpf at 10 μ M. Control (A and D), probes **1c** (B and E) and **1d** (C and F).

Conclusion

In conclusion, we have successfully developed a series of low cytotoxic *N*-2-substituted-1,2,3-triazoles **1a–g** as effective probes for the imaging of NFTs in human AD brain the olfactory epithelium sections by fluorescence microscopy. These probes display suitable optical characteristics for the detection of NFTs in the brain tissue and in the olfactory epithelium tissues *in vitro*. Besides, they provide significantly higher quantum yields in non-aqueous environment but display low quantum yields in polar solvents. The cytotoxicity assay with zebrafish embryos suggests that these probes have sufficient safety, which may make them valuable for further *in vivo* evaluation in animal models of AD.

Experimental Section

Chemistry

The ^1H -NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 500 spectrometer at 500 MHz, while the ^{13}C -NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 500 spectrometer at 125 MHz. Chemical shifts were reported downfield from Me_4Si . UV-Vis spectra were carried out by Shimadzu UV-2401PC. Mass spectrometry was performed on a MAT 95 double focusing sector field MS. All commercial chemicals were used without further purification. Flash column chromatography was carried out with Merck silica gel 60 (15–40 mm) and the residue was purified by column chromatography to afford the final products.

Physical properties

UV-Vis spectra (Perkin Elmer, Lambda 16) were obtained from solutions of the dyes (c : ca. 10^{-5} mol/L) in a series of solvents (spectroscopic grade). Extinction coefficients (ϵ_{max} : $\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) are given for the long-wavelength absorption band. Integral absorption $A_{\text{int}} = 2,303 \text{ c}^{-1} \text{ d}^{-1} [\text{Abs dv}]^1$ was calculated from the integration of the graphically isolated band at lowest wavenumbers, the oscillator strength $f(f = 4.39 \times 10^{-9} \epsilon_{\text{max}}^{-1} \times \text{c}^{-1} \text{ d}^{-1} [\text{Abs dv}]^1$ with n_D = refractive index of the respective solvent. Fluorescence spectra (Perkin Elmer, LS50B) were recorded at ambient temperature from aerated solutions of the dyes ($c = 10^{-5} - 10^{-7}$ mol/L) in the respective solvents, excitation wavelength: $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm. Quantum yields were determined by comparison with a solution of quinine in 0.1 M H_2SO_4 ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm; $\Phi = 0.577$) including refractive index correction according to Lackowicz.²

Immunohistochemical staining

Immunohistochemical staining was carried out on four micrometers thick sections by a Ventana Benchmark automated stainer (Ventana, Tuscon, AZ). The antibodies anti-PHF-Tau clone AT8 mAb (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL) and the Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana, Tuscon, AZ) were applied in staining.

In vitro neuropathological staining of AD brain sections

Four micrometers thick serial sections of paraffin-embedded brain sections of AD patients were used in these studies. The hippocampus (71-years-old male, CERAD-Score: 3, NFTs-level: V) sections and olfactory epithelium (78-years-old male) sections were deparaffinized and hydrated in distilled water. All the sections were immersed in 1 mM solution of compounds in the dimethyl sulfoxide (DMSO) for 10 minutes and then washed with methanol. The sections were differentiated in 1% acetic acid for 20 min. After washing with running water for 5 min, the sections were treated with Roti@-Mount FluorCare (from Sigma-Aldrich) and covered with coverslip. All the sections were analysed by fluorescence microscopy using a Axioskop microscope with a HBO100 fluorescence illuminator (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with the bandpass filter set 09 BP450-490, FT510, LP515, the filter set 02 G365, FT395, LP420 and the filter set 15 BP546, FT580, LP590 (all Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Informed signed consent of human tissues were obtained from either the patient or from next of kin.

In vivo zebrafish embryo assay for cytotoxicity

The zebrafish have been bred with a 14-h light-10-h dark cycle at 26.0 ± 0.5 °C. The embryos were obtained by natural mating and cultured in water. The embryos were collected and placed into 24-well plates with ten embryos per well. After the embryos developed more than 50% epiboly (around 6 hpf), they were treated with 5 and 10 μ M of *N*-2-aryl-1,2,3-triazole dyes **1c–d** in E2 solution. The phenotypes were evaluated using an AxiO Scope A1 microscope system from Carl Zeiss at 24 hpf and 72 hpf. All the experiments in the present study were carried out according to the ethical and welfare principles in legislation on animal research in Germany. Experimental Details.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the German Federal Ministry of Education and Research (Bundesministerium für Bildung und Forschung, Germany, 13N10636) and the Hans and Ilse Breuer-Stiftung.

Keywords: Alzheimer's disease · Neurofibrillary tangles · Imaging · Cytotoxicity · Fluorescent

- [1] M. Citron, Nat. Rev. Drug Discov. **2010**, 9, 387–398.
- [2] M. Prince, R. Bryce and C. Ferri, World Alzheimer Report 2011 **2011**.
- [3] a) L. M. Ittner and J. Gotz, Nat. Rev. Neurosci. **2011**, 12, 67–72; b) B. Bulic, M. Pickhardt, B. Schmidt, E. M. Mandelkow, H. Waldmann and E. Mandelkow, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **2009**, 48, 1740–1752; c) I. Benilova, E. Karran and B. De Strooper, Nat. Neurosci. **2012**, 15, 349–357.
- [4] J. Gu, U. R. Anumala, R. Heyny-von Haussen, J. Holzer, V. Goetschy-Meyer, G. Mall, I. Hilger, C. Czech and B. Schmidt, ChemMedChem **2013**, 8, 891–897.
- [5] a) W. E. Klunk, B. J. Bacska, C. A. Mathis, S. T. Kajdasz, M. E. McLellan, M. P. Frosch, M. L. Debnath, D. P. Holt, Y. Wang and B. T. Hyman, J. Neuropathol. Exp. Neurol. **2002**, 61, 797–805; b) W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergstrom, I. Savitcheva, G. F. Huang, S. Estrada, B. Aussen, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P.

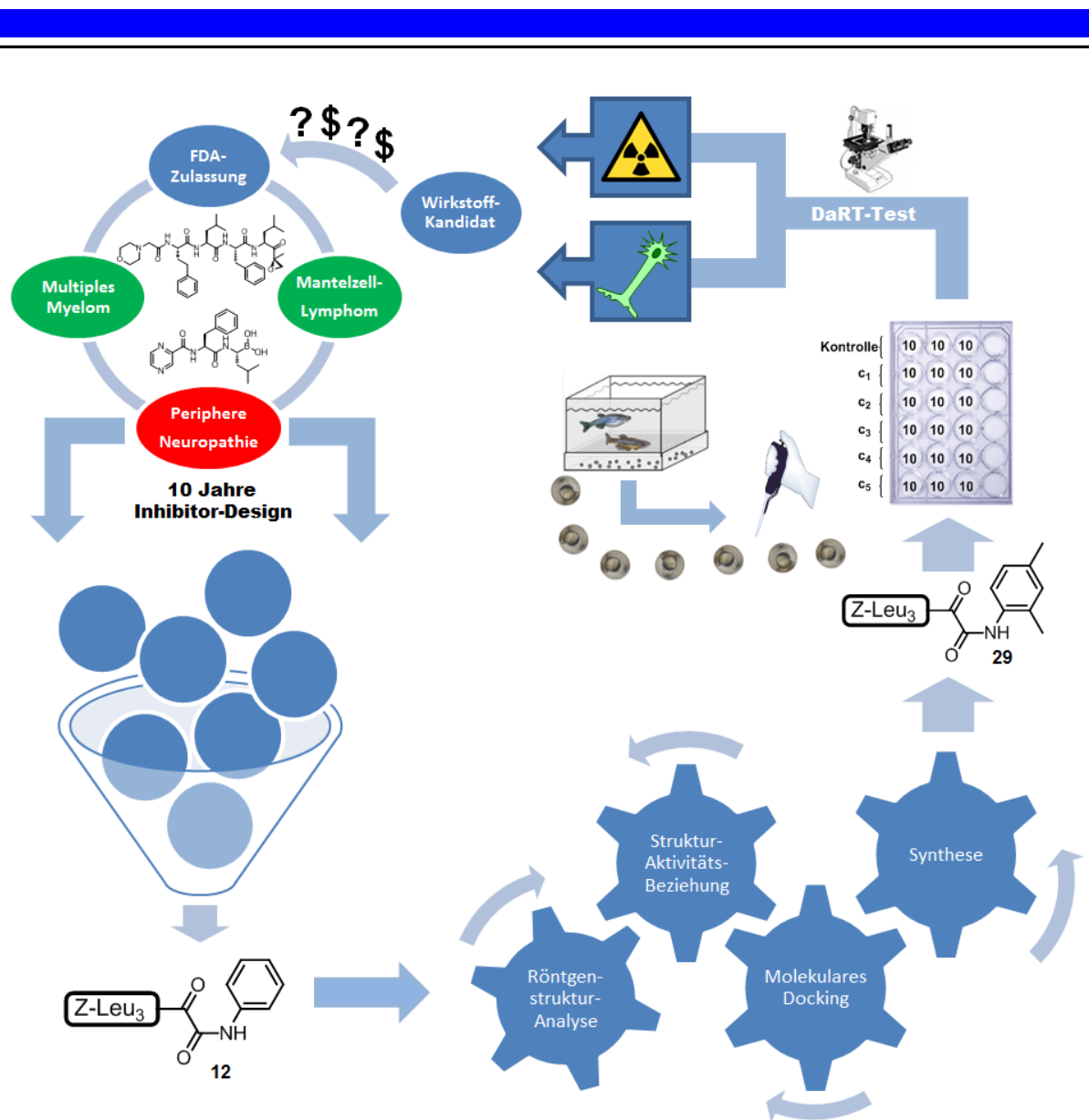
- Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis and B. Langstrom, *Ann. Neurol.* **2004**, 55, 306-319; c) Z. P. Zhuang, M. P. Kung, A. Wilson, C. W. Lee, K. Plossl, C. Hou, D. M. Holtzman and H. F. Kung, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 237-243; d) Z. P. Zhuang, M. P. Kung and H. F. Kung, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2841-2844.
- [6] K. Garber, *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30, 575.
- [7] N. Okamura, T. Suemoto, S. Furumoto, M. Suzuki, H. Shimadzu, H. Akatsu, T. Yamamoto, H. Fujiwara, M. Nemoto, M. Maruyama, H. Arai, K. Yanai, T. Sawada and Y. Kudo, *J. Neurosci.* **2005**, 25, 10857-10862.
- [8] M. T. Fodero-Tavoletti, N. Okamura, S. Furumoto, R. S. Mulligan, A. R. Connor, C. A. McLean, D. Cao, A. Rigopoulos, G. A. Cartwright, G. O'Keefe, S. Gong, P. A. Adlard, K. J. Barnham, C. C. Rowe, C. L. Masters, Y. Kudo, R. Cappai, K. Yanai and V. L. Villemagne, *Brain* **2011**, 134, 1089-1100.
- [9] J. Gu, U. R. Anumala, F. Lo Monte, T. Kramer, R. Heyny von Haussen, J. Holzer, V. Goetschy-Meyer, G. Mall, I. Hilger, C. Czech and B. Schmidt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 7667-7671.
- [10] D. T. Chien, S. Bahri, A. K. Szardenings, J. C. Walsh, F. Mu, M. Y. Su, W. R. Shankle, A. Elizarov and H. C. Kolb, *J. Alzheimers Dis.* **2013**, 34, 457-468.
- [11] a) D. Santa María, R. M. Claramunt, V. Bobosik, M. C. Torralba, M. R. Torres, I. Alkorta and J. Elguero, *Tetrahedron* **2013**, 69, 3027-3038; b) J. Jo, H. Y. Lee, W. Liu, A. Olsz, C. H. Chen and D. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 16000-16007.
- [12] a) O. De Moor, C. R. Dorgan, P. D. Johnson, A. G. Lambert, C. Lecci, C. Maillol, G. Nugent, S. D. Poignant, P. D. Price, R. J. Pye, R. Storer, J. M. Tinsley, R. Vickers, R. Well, F. J. Wilkes, F. X. Wilson, S. P. Wren and G. M. Wynne, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 4828-4831; b) W. Yan, Q. Wang, Q. Lin, M. Li, J. L. Petersen and X. Shi, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 5011-5018.
- [13] K. Cisek and J. Kuret, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 1434-1441.
- [14] A. Bolander, D. Kieser, C. Voss, S. Bauer, C. Schon, S. Burgold, T. Bittner, J. Holzer, R. Heyny-von Haussen, G. Mall, V. Goetschy, C. Czech, H. Knust, R. Berger, J. Herms, I. Hilger and B. Schmidt, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 9170-9180.
- [15] J. Sutharsan, M. Dakanali, C. C. Capule, M. A. Haidekker, J. Yang and E. A. Theodorakis, *ChemMedChem* **2010**, 5, 56-60.
- [16] a) A. E. Johnson, F. Jeppsson, J. Sandell, D. Wensbo, J. A. Neelissen, A. Jureus, P. Strom, H. Norman, L. Farde and S. P. Svensson, *J. Neurochem.* **2009**, 108, 1177-1186; b) S. Noel, S. Cadet, E. Gras and C. Hureau, *Chem Soc Rev* **2013**.
- [17] J. Gu, Ph.D. Dissertation **2013**, Technischen Universität Darmstadt.
- [18] a) F. Lo Monte, T. Kramer, J. Gu, U. R. Anumala, L. Marinelli, V. La Pietra, E. Novellino, B. Franco, D. Demedts, F. Van Leuven, A. Fuertes, J. M. Dominguez, B. Plotkin, H. Eldar-Finkelman and B. Schmidt, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4407-4424; b) M. Newman, G. Verdile, R. N. Martins and M. Lardelli, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1812, 346-352; c) S. K. Ko, X. Chen, J. Yoon and I. Shin, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2120-2130.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))
Revised: ((will be filled in by the editorial staff))
Published online: ((will be filled in by the editorial staff))

4 Zusammenfassung und Ausblick

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Proteasominhibitoren als potentielle Chemotherapeutika bzw. Radiosensibilisatoren zur Behandlung von Krebstumoren. Bortezomib **7** und Carfilzomib **9** sind Proteasominhibitoren, die bereits durch die FDA zugelassen sind und an Erkrankten mit nicht-soliden Tumoren, wie dem Multiplen Myelom, Anwendung finden. Das Auftreten der schweren Nervenkrankheit *Periphere Neuropathie* in 13-30% der Fälle ist die Schwachstelle der Wirkstoffklasse und wird auf mangelhafte Selektivität gegenüber dem Proteasom zurückgeführt. Vorarbeiten identifizierten bereits zahlreiche Strukturen mit unterschiedlichsten Wirkmechanismen zur Blockierung des proteasomalen Aktivzentrums Thr1. Die teils großen Strukturunterschiede und uneinheitliche Durchführung von Aktivitäts-Assays erschweren einen wissenschaftlichen Vergleich der Inhibitoren, sodass die Suche nach einer vielversprechenden Leitstruktur durch reine Literaturrecherche wenig effektiv ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden strukturanaloge Kopfgruppen-Inhibitoren synthetisiert und nach ausgiebiger biologischer Testung durch identische Assay-Bedingungen gegenübergestellt. Der α -Keto-Phenylamid-basierten Verbindung BSc2189 **12** konnte nach Analyse der Struktur im Komplex mit dem Hefe-Proteasom ein besonderes Selektivitätskriterium nachgewiesen werden: Neben der Besetzung der nicht-gestrichenen Seite des proteasomalen Bindungskanals, füllt der Phenylamid-Teil des Liganden (P1') zusätzlich die S1'-Kavität. Der endoproteolytische Charakter des Proteasoms begründet das Inhibitionspotential durch dieses einzigartige Selektivitätsprofil der Stoffklasse. Die Halbketal-Bildung durch Reaktion der Kopfgruppe mit Thr1O^y und Stabilisierung des Liganden durch Besetzung des sog. Oxyanion-Lochs durch die terminale Amid-Carbonylfunktion führt zu einem langsam reversiblen Bindungs-Mechanismus. Ein solches Verhalten ist nicht nur aus pharmokokinetischen Gründen wünschenswert, sondern ermöglicht zudem die Regeneration leicht geschädigter Zellen. α -Keto-Phenylamide könnten deshalb die Fähigkeit haben in festes Gewebe einzudringen, um den Einsatz von Proteasominhibitoren auf solide Tumorformen auszuweiten. Um aus dieser vielversprechenden Stoffklasse einen Kandidat der nächsten Wirkstoff-Generation präsentieren zu können, der den kommerziellen Wirkstoffen Bortezomib **7** und Carfilzomib **9** in jeder Hinsicht überlegen ist, galt es des Weiteren die Aktivität der Leitstruktur BSc2189 **12** durch eine medizinal-chemische Vorgehensweise zu optimieren. Es wurde eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aus unterschiedlichen Substitutionen des phenylischen C-Terminus des Inhibitors und deren Einfluss auf die biologische Aktivität des Liganden aufgestellt. Es stellte

sich heraus, dass durch apolare Elektronen-Donor-Substituenten Hydratisierungs-Effekte im Zuge des thermodynamischen Bindungsprozesses verhindert werden und die Liganden-Interaktion signifikant erhöht wird. Auf Grundlage dieser Erkenntnis konnte durch Molekulares Docking die zweifach durch Methyl-Gruppen substituierte Struktur von BSc4999 **29** identifiziert und anschließend synthetisiert werden. Es wurde ein Aktivitäts-/Selektivitätsprofil *in vitro* an isoliertem Proteasom erstellt, anhand dessen gezeigt werden konnte, dass BSc4999 **29** die $\beta 5$ -Untereinheit mit einem IC_{50} -Wert von 38 nM inhibiert, während $\beta 1$ und $\beta 2$ unbeeinflusst bleiben. Dies entspricht nahezu einer Halbierung des IC_{50} -Wertes der Leitstruktur BSc2189 **12** ($IC_{50,\beta 5} = 72$ nM), sodass die Erwartung an diese Optimierungsstudie erfolgreich erfüllt wurde. Die externe biologische Evaluation beinhaltete zudem den Nachweis der Zellgängigkeit an HeLa-Zellen und des langsam reversiblen Bindungsmodus durch ein Dialyse-Experiment. Die Kristallisation des Liganden im Komplex mit dem Hefe-Proteasom bestätigte die vermutete Lage des Liganden am Aktivzentrum mit einer Auflösung der Kristallstruktur von 2,5 Å.




Schema 7: Schematische Zusammenfassung des Wirkstoff-Design-Projekts. Start: links oben, gegen den Uhrzeigersinn. Die schwere Nebenwirkung *Periphere Neuropathie* der zugelassenen Proteasominhibitoren führte zur Entwicklung zahlreicher Wirkstoff-Alternativen. Hieraus wurde eine α-Keto-Phenylamid-basierte Leitstruktur identifiziert, die durch medizinisch-chemisches Vorgehen optimiert werden konnte. Neben biochemischen Assays an isoliertem Proteasom und an Zell-Systemen, wurden erste *in vivo*-Tests an Zebrafischlarven durchgeführt, um BSc4999 **29** für weiterführende Tests im Rahmen präklinischer Studien vorzuschlagen.

Erste toxikologische Untersuchungen konnten bereits im eigenen Labor durchgeführt werden. Hierbei galt es die Toxizität von Proteasominhibitoren, deren Eignung als Strahlensensitiva und das Auftreten von Nervenschäden zu testen. Hierzu wurden zum einen bereits publizierte Methoden am Zebrafisch-Embryo adaptiert und weiterentwickelt, und zum anderen neue Anwendungen des Modellorganismus geschaffen. Am Beispiel der Neuentwicklung BSc4999 **29** konnte nach Röntgen-Bestrahlung der Zebrafisch-Embryonen in Wirkstoff-Lösung eine erhöhte Sterberate im Vergleich zur Kontrolle ohne Wirkstoff-Lösung gezeigt und somit eine

radiosensitivierende Wirkung nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Nebenwirkung der zugelassenen Proteasominhibitor-Wirkstoffe, *Periphere Neuropathie*, wurde BSc4999 **29** an einem selbst entwickelten Motorneuronen-Toxizitäts-Assay getestet. Als positive Referenz kam Bortezomib **7** zum Einsatz, das bereits bei niedrigen Wirkstoffkonzentrationen ein abnormales Fluchtverhalten von Zebrafischlarven zeigt. Dieser Fluchtreflex wird von einer Hochgeschwindigkeits-Kamera aufgezeichnet und durch eine speziell entwickelte Software ausgewertet, die den Winkel der Körperbiegung nach externem Stimulus misst und zeitaufgelöst aufträgt. Die starke Abweichung der regelmäßig abklingenden Körperauslenkungs-Amplitude einer gesunden Larve wird als Anzeichen einer Nervenschädigenden Wirkung der getesteten Verbindung aufgefasst. Im Gegensatz zu Bortezomib **7**, war dieser Test mit BSc4999 **29** negativ. Es wird kein abnormaler Fluchtreflex der Larven bei Verdünnungen unter der zuvor ermittelten, Apoptose-auslösenden Konzentration des Wirkstoffs, beobachtet.

Neben dem Design und der Synthese neuer Proteasominhibitoren, als potentielle Krebs-Wirkstoffe der nächsten Generation, wurde ein rein mechanistischer Ansatz, mit der Absicht den komplexen Wirkmechanismus des Proteasoms im Detail besser zu verstehen, verfolgt. Der ursprünglich postulierte Mausfallen-artige Mechanismus der Substratspaltung am aktiven Zentrum wurde durch kinetische Untersuchungen an isoliertem Proteasom zunächst widerlegt. Konsens der Arbeit führte zu der Erkenntnis, dass die $\beta 5$ -Untereinheit offensichtlich bevorzugt nach kleinen, neutralen Aminosäure-Resten (SNAAP) und nicht, nach der verbreiteten Auffassung, nach großen, verzweigten Resten (BrAAP) schneidet. Deshalb ist die Bezeichnung der $\beta 5$ -Untereinheit als Chymotrypsin-artig nicht treffend und sollte zukünftig als Elastase-artig klassifiziert werden. Fluoreszente Standard-Referenzsubstrate zur Aktivitätsbestimmung in Proteasom-Assays mit großen, verzweigten P1-Aminosäure-Resten sollten entsprechend durch fluoreszente Substrate mit kleinen, neutralen P1-Resten ersetzt werden.

Ein letzter Schwerpunkt der Arbeit lag in der Synthese und histologischen Evaluation niedermolekularer Fluoreszenzsonden an verschiedenen Modellen der Alzheimer Demenz. Hierbei wurde eine zehnstufige Syntheseroute entwickelt und optimiert, die zu vielseitig derivatisierbaren Bis-arylvinyl-pyridazinen führte. Diese Fluorophore wurden durch histochemische Färbung an menschlichem Hirngewebe auf ihre Fähigkeit getestet, pathologische Merkmale der Alzheimer Demenz (Tau-Fibrillen und A β -Plaques) selektiv zu markieren. Zudem wurden unterschiedlich substituierte Benzotriazole, die sich durch



besonders hohe Quantenausbeuten auszeichnen, durch das identische Färbeprotokoll an menschlichem Hirngewebe präpariert, um positiv markierte pathologische Merkmale, multispektral aufgelöst, abzubilden. Durch dieses Vorgehen wird zukünftig die Erzeugung „falsch positiver Ergebnisse“ der Datenanalyse durch Artefakte oder Fehlinterpretationen reduziert.

5 Methodenteil

5.1 Protokolle für Fisch-Embryo-Medien

Die verwendeten Protokolle für Fisch-Embryo-Medien stammen aus dem Buch *Zebrafish* von Christiane Nüsslein-Volhard und Ralf Dahm.^[77]

5.1.1 E3-Medium zur Arbeit mit Fisch-Embryonen

- 5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM CaCl₂; 0,33 mM MgSO₄; 10⁻⁵ % Methylen Blau.
- E3-Medium kann als 60 fach-konzentrierte (60x)-Stammlösung (ohne Methylenblau) vorbereitet und im Kühlschrank aufbewahrt werden. Verdünntes 1x E3-Medium kann über Wochen bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
- Für 10 L der 60x E3-Stammlösung wird folgende Salzmischung in demineralisiertem Wasser gelöst: 172g NaCl; 7,6 g KCl, 29 g CaCl₂*2H₂O; MgSO₄*7H₂O.
- 160 mL der 60x-Stammlösung werden auf 10 L mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt, um 1x E3-Medium zu erhalten. 30 mL einer 0,01%igen Methylenblau-Stammlösung wird als Fungizid additiv zugefügt.

5.1.2 E2-Pen/Strep-Medium zur Nachzucht der Tiere

- Für 1 L der 20x E2-Stammlösung wird folgende Salzmischung in demineralisiertem Wasser gelöst: 17,5 g NaCl; 0,75 g KCl; 2,4 g MgSO₄; 0,41 g KH₂PO₄; 0,12 g Na₂HPO₄. Für die CaCl₂-Stammlösung werden 7,25 g CaCl₂ in 100 mL demineralisiertem Wasser gelöst und für die NaHCO₃-Stammlösung werden 3 g NaHCO₃ in 100 mL demineralisiertem Wasser gelöst. Die Stammlösungen sollte im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- Für 1 L 1x E2-Medium werden 50 mL 20x E2-Stammlösung, 2 mL der CaCl₂-Stammlösung und 2 mL der NaHCO₃-Stammlösung vermischt und das Volumen von 1 L mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt.

-
- E2-Pen/Strep-Medium: Stammlösungen mit 60 mg/mL Penicillin und 100 mg/mL Streptomycin werden angesetzt und im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Die Stammlösungen werden im Verhältnis 1:500 mit 1x E2-Medium vermischt.

5.2 Haltung der adulten Fische

Der Zebrafisch ist im gebärfähigen Alter zwischen 6 und 24 Monaten. Die Becken stehen in einem beheizten und durchlüfteten Raum ohne Fenster. Ein 12h/12h Tag/Nacht-Rhythmus wird durch Zeitschaltuhr-gesteuertes Oberlicht gewährleistet. Der Standard-Betrieb eines Beckens erfolgt mit zwei Aquarium-Filtern (z.B. Eheim Biopower 160) mit Plastik- oder echten Pflanzen besetzt. Becken mit echtem Pflanzenbesatz benötigen eine zusätzliche Lichtquelle. Abbildung 13 zeigt jeweils ein Becken mit Echt-Pflanzen- und Plastik/Echt-Pflanzen-Besatz.



Abbildung 13: Möglicher Besatz der Becken für adulte Tiere. Oben: Becken mit reiner Echt-Pflanzen-Besetzung und Kies-Boden. Unten: Becken mit Mischung aus Plastik- und Echt-Pflanzen-Besatz.

Je nach Größe der Aquarien werden mindestens 2 Welse zugesetzt, die neben ihrer Funktion als Algenfresser als Sensor für ein „Kippen“ der Wasserqualität fungieren können, da Welse besonders empfindlich auf niedrigen Sauerstoff- oder hohen Nitrit-Gehalt und Toxine im Wasser reagieren. Adäquate Wasserqualität wird durch regelmäßigen Wasserwechsel und Beckenreinigung gewährleistet. Häufigkeit und Menge des Wasserwechsels hängt vom Fisch- und Pflanzenbesatz der Becken ab. Es wird eine 50/50-Mischung aus Darmstädter Leitungswasser (Gesamthärte: 19 °dH) und demineralisiertem Wasser verwendet, um weiches

Wasser zu gewährleisten. Es werden keine Additive, wie beispielsweise Antibiotika, zugesetzt. Der Fischbesatz sollte nicht höher als 0,2 Tiere/Liter sein. Gefüttert wird mit Ausnahme von Wochenenden 2-3 mal/Tag mit trockenem Flockenfutter (TetraMin Flockenfutter) und 1 mal/Woche mit Frostfutter (Marke coolfish: Rote oder weiße Mückenlarven). Die Tagesration eines adulten Tiers liegt bei 1,5-3 mg/Tag. Fütterung, Wasserwechsel und regelmäßige Kontrolle der Wassertemperatur und -qualität wird anhand einer Excel-Tabelle dokumentiert.

5.3 Nachzucht

Das Kaufen adulter Tiere aus dem Aquaristik-Handel ist aufgrund des Risikos eines Keim-Eintrags ist zu vermeiden. Der Bestand wird durch regelmäßige Nachzucht aufrechterhalten. Die Nachzucht sollte die ersten 7 Tage in Petrischalen (< 20 Jungtiere/Petrischale) bei 27°C gehalten werden. Hierzu kann der beheizbare Rüttler (Marke VWR) benutzt werden (Abbildung 14).



Abbildung 14: Beheizbarer Rüttler von der Firma VWR zur Aufbewahrung der Embryonen während der Aufzucht und laufender Experimente.

Nach 1 dpf kann das Fischwasser aus der Petrischale durch E3-Medium ausgetauscht werden, um eine Überlebensrate der Larven von über 90% zu gewährleisten. Nachdem sich die Larven nach 3 dpf vom schützenden Chorion befreit haben, müssen die verbleibenden Eierschalen entfernt werden.

Tipp: Die Petrischale im Rüttler mittig positionieren, die Schüttelgeschwindigkeit auf 100 stellen und etwa 5 min warten. Es wird sich ein Wirbel bilden, der Ei-Überreste sammelt, sodass diese mit einer Pipette effektiv entfernt werden können, ohne dabei Larven zu verlieren.

Ab 7 dpf können die Jungtiere in größere Becken, gefüllt mit E3-Medium, umgesiedelt werden. Es wird zunächst mit Staubfutter (Marke JBL, NovoTom für Fischbrut), nach etwa 14 dpf mit größerem Trockenfutter (TetraMin Baby) und nach etwa 40 dpf mit dem üblichen Trockenfutter (TetraMin Flockenfutter) gefüttert. Während des ersten Monats wird 3 mal/Woche mit wenig Cyclops-Frostfutter (Zookauf Cyclops; 98% Cyclops, 2% *Ascomyllum nodosum*) zugefüttert. Nach 6-8 Wochen sind die Jungtiere groß genug, um nicht mehr von den adulten Tieren gefressen zu werden und können zu Ihnen in die größeren Becken gesetzt werden.

5.4 Laich Prozedur

Zur Gewinnung des Zebrafisch-Laichs eignen sich die Zuchtbehälter der Firma Aquatic Habitats (Abbildung 15).



Abbildung 15: Zuchtbehälter der Firma Aquatic Habitats. Ein adultes Pärchen wird mit dem Besatz von Plastik-Pflanzen über Nacht im Zuchtbehälter gehalten. Naturgemäß kommt es in den Morgenstunden zur Ei-Ablage. Die Einlage ist gelöchert, sodass die Eier zu Boden fallen und Laichraub verhindert wird. Die Eier können nach Entfernung der Einlage entnommen werden.

Die adulten Tiere werden am Abend vor der Laichablage paarweise in die, mit Aquarium-Wasser befüllten, beheizten und gedeckelten Behälter überführt und mit Deckung bietenden Kunststoffpflanzen bestückt. Naturgemäß kommt es in den frühen Morgenstunden des Folgetages zur Eiablage. Um Laichraub des Zebrafischs zu verhindern, fallen die Eier durch spezielle Netzvorrichtungen zu Boden und können, nach Entfernung der gelöcherten Einlage, entnommen werden. Dies kann durch vorsichtiges Gießen durch ein Plastik-Teesieb erfolgen. Das zu frühe Wechseln des Fischwassers mit Nährmedium verursacht erfahrungsgemäß das Absterben der Embryonen. Der beim Zebrafisch-Embryo nach 5 hpf erreichte Zustand der so genannten 50%igen Epibolie ist der frühestmögliche Zeitpunkt des Medium-Wechsels, da die Blastula des Embryos eine gleichförmige Dicke erreicht hat und der Organismus dadurch weniger empfindlich auf Änderungen der Umwelt reagiert. Es ist völlig ausreichend, nach 1 dpf sterile Eier am Lichtmikroskop auszusortieren und das Fischwasser nach dreimaliger Waschprozedur durch E3-Medium zu ersetzen. Die Embryonen werden entsprechend der Verwendung in Petrischalen oder 24-well Mikrotiterplatten überführt. Benutzte Laich-Behälter werden in der Spülmaschine gereinigt. Vor jedem Laich-Ansatz sollten die Becken nochmals oberflächlich mit heißem Leitungswasser gespült werden.

5.5 Der DarT-Test

Der DarT-Test dient der Ermittlung der nicht-toxischen Konzentrations-Obergrenze eines Wirkstoffs bzw. der Ermittlung der effektiven Konzentration, die das Auftreten spezifischer Phänotypen im Laufe der embryonalen Entwicklung auslöst. Ferner ist jeder beobachtbare Effekt am Embryo nach Zugabe des Wirkstoffs ein Nachweis für dessen Permeabilität durch das schützende Chorion bzw. für dessen Aufnahme über die Haut. Beispiele für solche Effekte sind: Denaturierung des Embryos, ausbleibende Entwicklung der linearen Schwanz-/Rückenstruktur, ausbleibende Wirbelentwicklung oder die nicht-Detektierbarkeit des Herzschlags.

Vorsicht: Ist selbst bei hohen Konzentrationen des Wirkstoffs kein Effekt nachweisbar, bedeutet das nicht zwingend, dass die Verbindung nicht-toxisch ist. Es muss in jedem Fall gezeigt werden, dass der Wirkstoff den Organismus erreicht, also permeabel ist.

Fluoresziert der Wirkstoff im Bereich außerhalb der Eigenfluoreszenz des Embryos, kann ein Permeabilitäts-Nachweis über Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgen. Ist dies nicht möglich kann folgende Prozedur angewandt werden: Ein Wurf (bis zu 150-200 Eier, 1 dpf) sollte mindestens 3 Stunden in gesättigter Wirkstofflösung verweilen. Daraufhin wird dreimal mit

E3-Medium gewaschen und trocken, mechanisch dechorioniert. Nach der Dechorionierung wird weitere zweimal gewaschen. Die Waschvorgänge sollten möglichst schnell durchgeführt werden. Die Embryonen werden in ein Eppendorf-Gefäß überführt, ca. 0,5 mL Wasser zugeführt und anhand eines Magnet-Rührstabs ca. 2 Stunden am Magnetrührer gemahlen. Die 0,5 mL-Mischung kann im Anschluss auf eine RP-18-Säule aufgetragen werden und Enzym-Rückstände werden am Wasserstrahl-Vakuum entfernt. Es wird mit organischem Lösemittel (ca. 1 mL Acetonitril) nachgespült, um den organischen Wirkstoff zu erhalten. War die Verbindung permeabel, sollte diese in der organischen Lösung zumindest in Spuren per Massenspektrometrie nachweisbar sein.

Um die Wasserlöslichkeit der meist organischen Wirkstoffe zu erhöhen können diese mit wenig DMSO vorgelöst werden. Es ist darauf zu achten, dass Experiment-Lösungen weniger als 1 Vol% DMSO enthalten und den Kontrollen dieselbe Menge an DMSO zugefügt wird. Jeder DarT-Test sollte in mindestens zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt werden. Jede Wirkstoff-Konzentrationsreihe/Kontrolle sollte im Triplikat mit je 10 Embryonen pro Replikat durchgeführt werden, um statistische Signifikanz der erzeugten biologischen Daten zu gewährleisten.^[90] Experimente werden spätestens 6 dpf abgebrochen. Eine typische Auswertung eines DarT-Tests am Beispiel des Kinase-Inhibitors Sunitinib **30** ist in Abbildung 16 zu sehen.

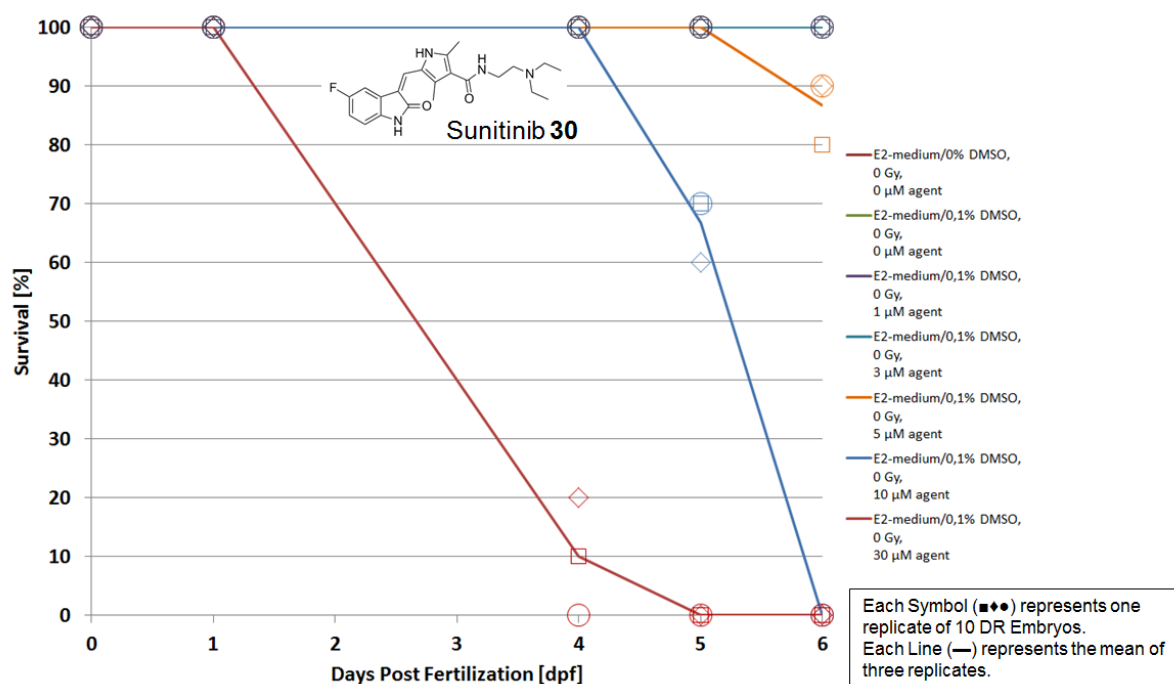


Abbildung 16: Beispiel der Auswertung eines DarT-Tests. Bei der getesteten Substanz handelt es sich um den Kinase-Inhibitor Sunitinib **30**. Als Endpunkt und Charakteristikum eines toten Embryos wurde das Ausbleiben des Herzschlags gewählt. Es ist zu

erkennen, dass der Wirkstoff ab der Konzentration von 5 μM toxisch wirkt. Jede Farbe steht für ein Triplikat-Experiment einer Konzentrations-Reihe bzw. der Kontroll-Reihe. Für jedes Replikat sind die Messpunkte durch unterschiedliche Symbole gegeben. Es werden keine Fehlerbalken angegeben, da es bei dieser Beispiel-Auswertung um ein Replikat-Experiment handelt.^[90]

Die Labor-interne Infrastruktur ermöglicht Entwicklungs-Analysen am Licht- oder Fluoreszenzmikroskop und Dokumentierung sämtlicher Ergebnisse am Computer (Abbildung 17).



Abbildung 17: Labor-interne Infrastruktur zur Entwicklungs-Analyse der Embryonen-Experimente am Lichtmikroskop (oben) bzw. am Fluoreszenzmikroskop (unten) und deren Dokumentierung am Computer (unten).

5.6 Das Strahlentoxizitäts-Assay

Die Empfindlichkeit eines lebenden Organismus gegenüber ionisierender Strahlung kann anhand unterschiedlich wirkender Substanzen modifiziert werden. Wirkstoffe, die den Organismus gegenüber Strahlen-induziertem Schaden sensitivieren werden Strahlensensibilisatoren und solche die den Organismus vor Strahlenschäden schützen werden Strahlenprotektoren genannt. Dieses *in vivo*-Assay am Zebrafisch-Embryo-Modell-System dient der Evaluierung des synergistischen Effekts aus Wirkstoff und ionisierender Strahlung und führt zur Identifikation von Radiosensibilisatoren bzw. Radioprotektoren.

Bevor dieses Assay durchgeführt werden kann, muss ein DarT-Test des Wirkstoffs erfolgreich abgeschlossen werden (Abschnitt 5.5). Da der DarT-Test als Kontroll-Experiment für das folgende Strahlentoxizitäts-Assay fungiert, darf die dabei verwendete Menge von 0,1 Vol% DMSO nicht überschritten werden. Das Ausbleiben des Herzschlags ist der Endpunkt des Assays. Die maximale nicht-toxische Konzentration wird zur Durchführung des Strahlentoxizitäts-Assays verwendet. Bis zur Wirkstoff-Zugabe nach 1 dpf ist das Vorgehen analog zum DarT-Test. 3 Stunden nach der Zugabe erfolgt die Bestrahlung durch Röntgenstrahlung mit 20 Gy (Abbildung 13). Diese Dosis wurde bewusst hoch gewählt, um bis 6 dpf einen signifikanten Effekt sehen zu können, bevor das Experiment abubrechen ist.

Tipp: Ein Strahlentoxizitäts-Experiment sollte durch Paarung adulter Zebrafische an einem Mittwochabend gestartet werden. Bei Laich-Erfolg Donnerstag Früh (0 dpf) können die Embryonen Freitagvormittag (1 dpf) gewaschen werden und die Konzentrationsreihen des Wirkstoffs angesetzt werden, um 3 Stunden später die Bestrahlung durchzuführen. Über das Wochenende können die Embryonen bei 27°C im beheizbaren Rüttler aufbewahrt werden. Die Bestimmung der Überlebensrate am Lichtmikroskop kann Montag (4 dpf), Dienstag (5 dpf) und Mittwoch (6 dpf) erfolgen.



Abbildung 18: Kammer zur Bestrahlung der Mikrotiterplatten. Die Röntgenstrahlen-Quelle befindet sich unter der Probe, sodass Energieabsorptions-Effekte durch Wasser vermieden werden und die Embryonen die eingestellte, definierte Dosis erhalten. Die Kammer wird in regelmäßigen Abständen dosimetrisch vermessen.

Beim Vorlösen der Wirkstoffe mit DMSO muss darauf geachtet werden, dass die endgültige Konzentration von 0,1 Vol% nicht überschritten wird, da DMSO bei höheren Konzentrationen radioprotektiv wirkt und das Assay-Ergebnis verfälscht.^[91] Die Durchführung des Assays erfolgt in 24-well Mikrotiterplatten und beinhaltet:

1. Eine Triplikat-Gruppe unbestrahlter Embryonen in E2-Medium ohne Wirkstoff
2. Eine Triplikat-Gruppe bestrahlter Embryonen in E2-Medium ohne Wirkstoff
3. Eine Triplikat-Gruppe unbestrahlter Embryonen in E2-Medium mit untoxischer Wirkstoff-Konzentration (aus DarT-Test)
4. Eine Triplikat-Gruppe bestrahlter Embryonen in E2-Medium mit untoxischer Wirkstoff-Konzentration (aus DarT-Test)

Diese 4 Gruppen werden mit 10 Embryonen pro Replikat durchgeführt, sodass ein Experiment eine Anzahl von 120 Eiern umfasst, was durch die Eiablage eines adulten Weibchens gut zugänglich ist. 1. ist die Kontroll-Gruppe, die gewährleistet, dass der Wurf des adulten Weibchens gesund war. Liegt die Sterberate dieser Gruppe über 10% muss das Experiment erneut durchgeführt werden. Möglicherweise sind die adulten Tiere krank. 2. ist die Kontroll-Gruppe der reinen Strahlen-Toxizität. Die Sterberate nach Bestrahlung mit 20 Gy

muss immer vergleichbar sein. Ist dies nicht der Fall, muss die Dosisleistung der Strahlenquelle überprüft werden. 3. reproduziert das Ergebnis des zuvor durchgeführten DarT-Tests. Das Risiko systematische Fehler, etwa beim Ansetzen der Wirkstoff-Konzentrationen, wird hierdurch reduziert. 4. liefert den synergistischen Effekt aus Strahlung und Wirkstoff. Liegt die Überlebensrate der Embryonen nach 6 dpf deutlich unter der Rate aus 2., so wurde eine Strahlen-sensitivierende Wirkung der Substanz nachgewiesen. Liegt sie deutlich darüber, wirkt die Substanz radioprotektiv.

Im Rahmen des Assay-Aufbaus wurden positive Referenzen für ein Radiosensitivum und für ein Radioprotektivum etabliert. Sunitinib **30** ist ein unselektiver Kinase-Inhibitor. Nach Induzierung eines DSB's werden eine Vielzahl an Signalkaskaden zur DNA-Reparatur aktiviert, darunter eine Vielzahl an Proteinkinasen.^[92] Es ist deshalb nicht überraschend, dass ein Multi-Kinase-Hemmer wie Sunitinib **30** den DNA-Reparatur-Prozess stört und radiosensitivierend wirkt.^[93-94] In Abbildung 16 wurde bereits der DarT-Test mit Sunitinib **30** gezeigt und Abbildung 19 fasst ein komplettes Strahlentoxizitäts-Experiment zusammen.

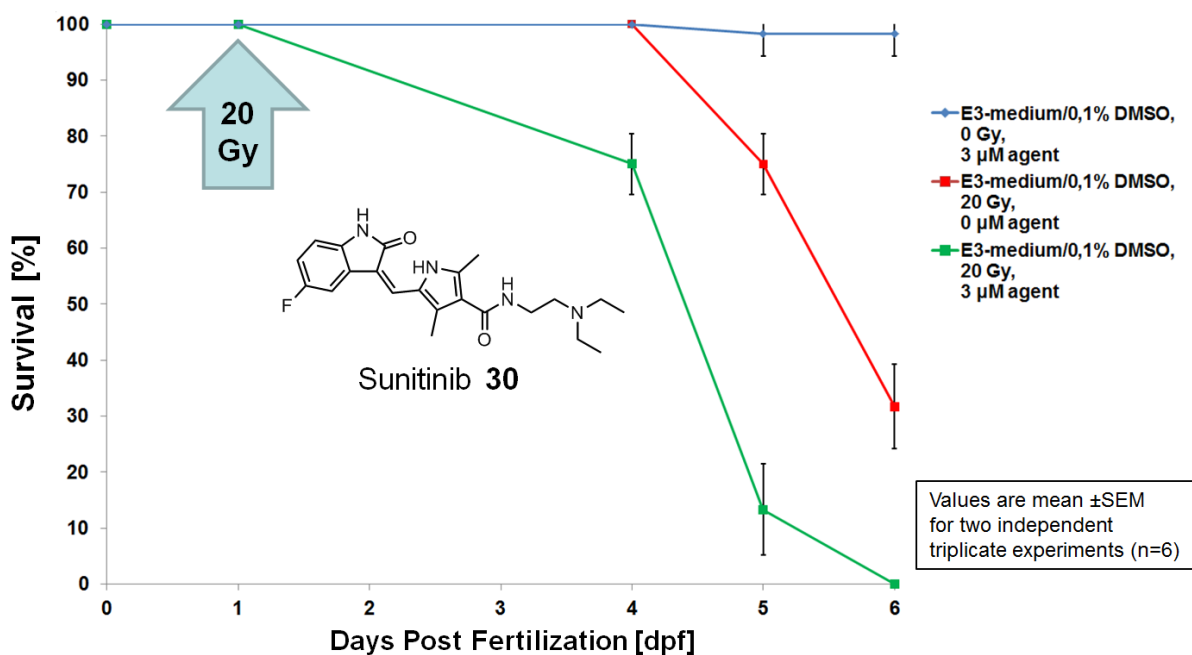


Abbildung 19: Der synergistische Effekt aus Röntgenbestrahlung (20 Gy) und 3 µM Sunitinib-Lösung (grün). Es ist zu erkennen, dass diese Wirkstoff-Konzentration ohne Bestrahlung (blau) ungiftig ist. Erst in Kombination mit Röntgenstrahlung (grün) ist eine deutlich höhere Sterberate der Embryonen bis zum Tag 6, als bei reiner Bestrahlung derselben Dosis ohne Wirkstoff-Zugabe (rot), zu erkennen. Diese Auswertung beinhaltet die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten aus 10 Embryonen pro Replikat durchgeführt wurden. Fehlerbalken stehen für den Standardfehler.^[90]

Zur Etablierung einer positiven Referenz für Radioprotektoren fiel die Wahl auf den zugelassenen Wirkstoff Amifostin **21**. **21** wird zum Schutz des umliegenden gesunden Gewebes bei Strahlen-unterstützter Tumorthherapie eingesetzt und wurde bereits in einem vergleichbaren Assay an Zebrafischlarven getestet.^[95] Das Ergebnis des Strahlentoxizitätsexperiments nach vorangestelltem DarT-Test ist in **21** zu sehen.

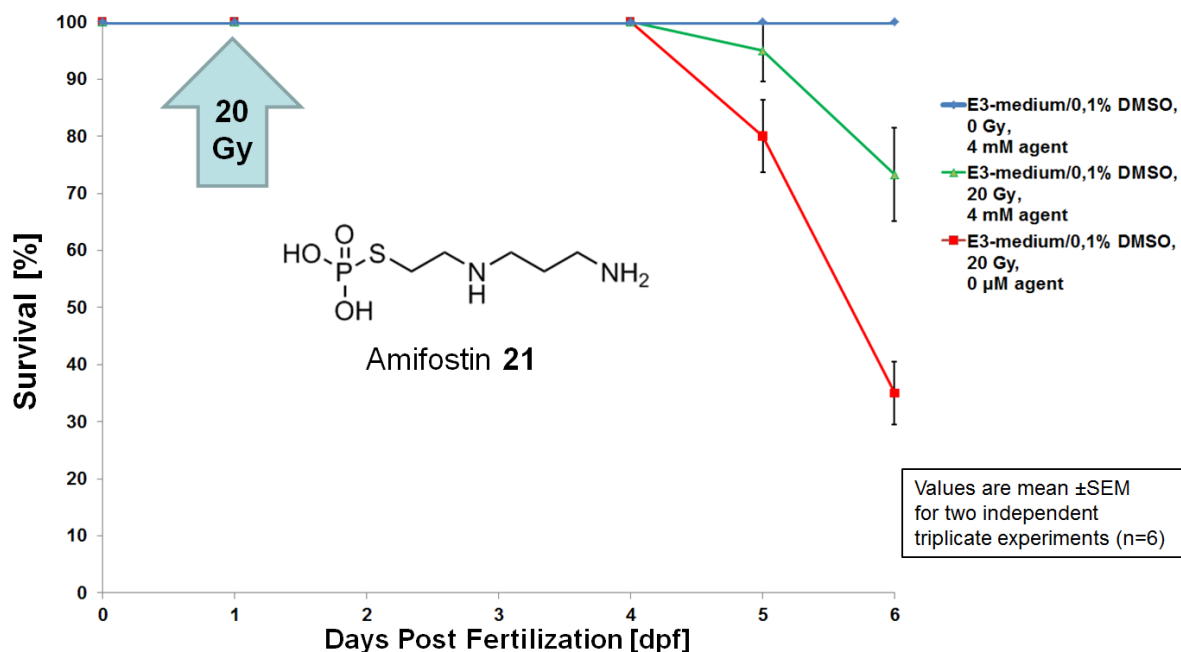


Abbildung 20: Der synergistische Effekt aus Röntgenbestrahlung (20 Gy) und 4 mM Amifostin-Lösung (grün). Es ist zu erkennen, dass diese Wirkstoff-Konzentration ohne Bestrahlung (blau) ungiftig ist. Erst in Kombination mit Röntgenstrahlung (grün) ist eine deutlich niedrigere Sterberate der Embryonen bis zum Tag 6, als bei reiner Bestrahlung derselben Dosis ohne Wirkstoff-Zugabe (rot), zu erkennen. Diese Auswertung beinhaltet die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten aus 10 Embryonen pro Replikat durchgeführt wurden. Fehlerbalken stehen für den Standardfehler.^[90]

5.7 Das Motorneuronentoxizitäts-Assay

Da *Periphere Neuropathie* in über 30% der mit Bortezomib **7** behandelten und in über 13% der mit Carfilzomib **9** behandelten Patienten auftritt, ist ein Assay für die Bestimmung der Motorneuronentoxizität für die Evaluierung der neu entwickelten Proteasominhibitoren essentiell.^[27, 30] Das Vorgehen dieses Assays knüpft an eine verhaltensanalytische Vorarbeit, in der die Neuronentoxizität von Bortezomib **7** in einem Fluchtreflex-Assay nachgewiesen werden konnte.^[96] Somit eignet sich Bortezomib **7** hervorragend als Referenzsubstanz für die Bestimmung der Motorneuronentoxizität von Proteasominhibitoren in diesem Assay (Abbildung 23C). Der Fluchtreflex wird aufgezeichnet und der Winkel der Körperbiegung bzw. den Winkel der Auslenkung der Schwanzflosse wird vermessen, indem Spitze des

Kopfes, Dottersack und Schwanzspitze über den Zeitraum von 3 Sekunden verfolgt werden (Abbildung 21).

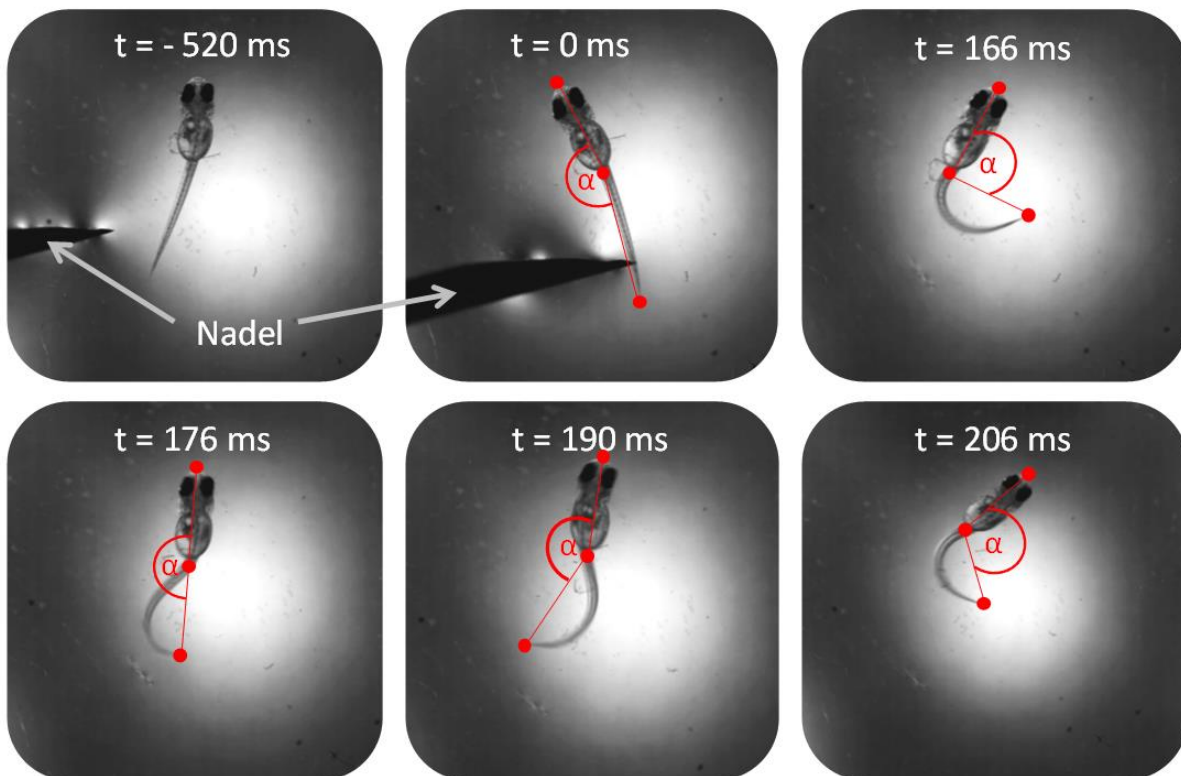


Abbildung 21: Fluchreflex einer 3 dpf alten Zebrafischlarve. Gezeigt ist die gesunde Ausprägung des Fluchreflexes durch C-Krümmung der Kopf-Schwanz-Achse über einen Zeitraum von 206 ms nach manuellem Nadel-Stimulus.

Die praktische Durchführung des Experiments gestaltet sich folgendermaßen:

Zebrafischlarven werden einen Tag in Fischwasser bei 26°C aufbewahrt. Nach 1 dpf werden sterile Larven aussortiert. Gesunde Larven werden in E3-Medium überführt und ruhend bei 26°C aufbewahrt. Am dritten Tag (3 dpf) haben sich die Larven vom schützenden Chorion befreit und der Fluchreflex ist vollständig entwickelt. Die Larven werden in unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen in E3-Medium mit höchstens 1 Vol% DMSO als Lösungsvermittler inkubiert. Als Kontrolle dienen Larven in E3-Medium mit dem gleichen Volumenanteil an DMSO. Je nach Toxin kann die Inkubationszeit und Dosis variiert werden. Liegt die Überlebensrate der Kontrolle während des Experiments unter 100%, so können keine verwertbaren Daten erhoben werden.

Einzelne Larven werden auf einen Objekträger mit Vertiefung (Kalk-Natron-Glas; 76 x 26 mm; 1,2-1,5 mm Stärke; Ø der Vertiefung 15 mm mit einer Tiefe von 0,6-0,8 mm) überführt und mit ca. 5 Tropfen E3-Medium beschichtet. Der Fluchreflex wird an der Schwanzspitze

der Larve mit einer Nadel ausgelöst und mit einer Hochgeschwindigkeits-Kamera (Bildrate: 500 Bilder/Sek.; Dauer: 3 Sek.) aufgezeichnet. Der apparative Aufbau und die verwendete Kamera sind in Abbildung 22 gezeigt.

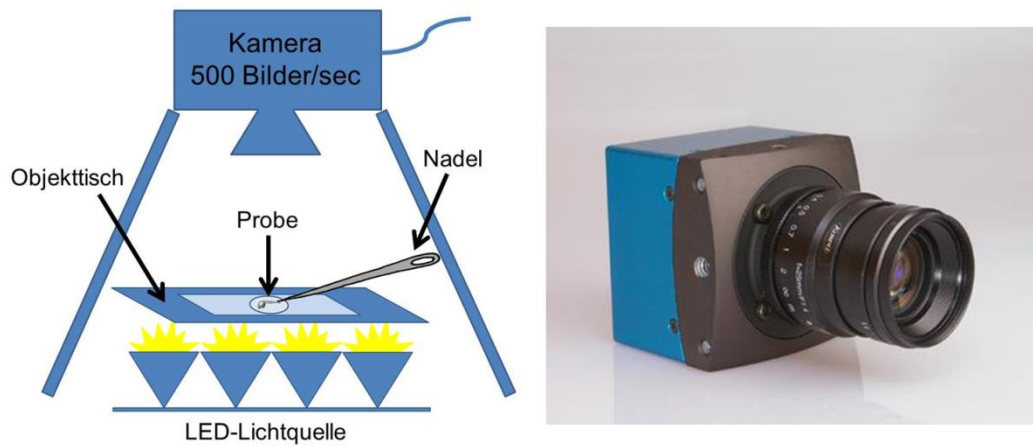
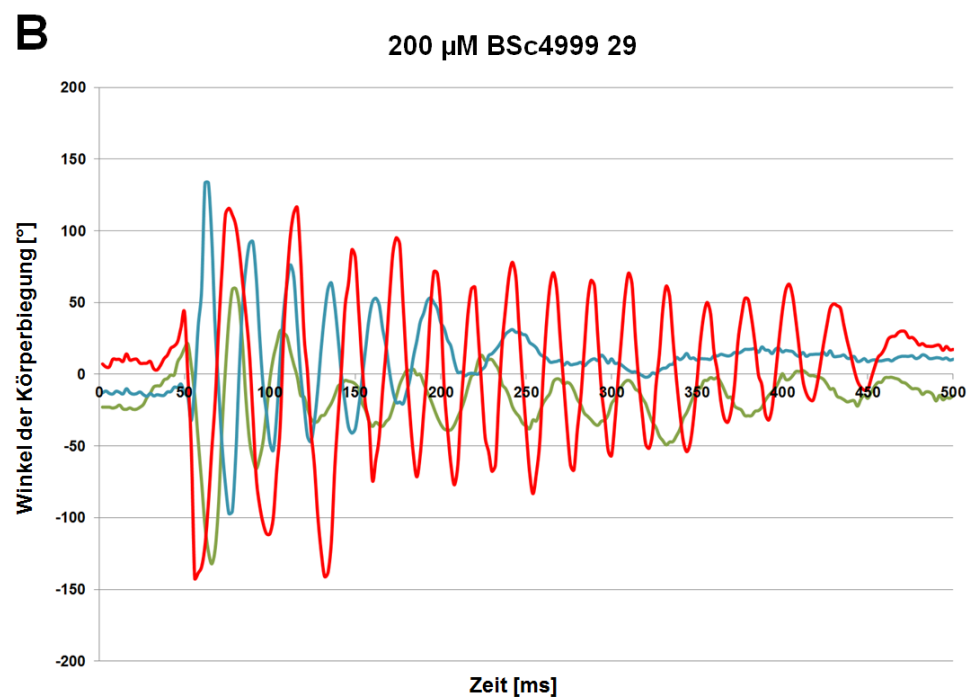
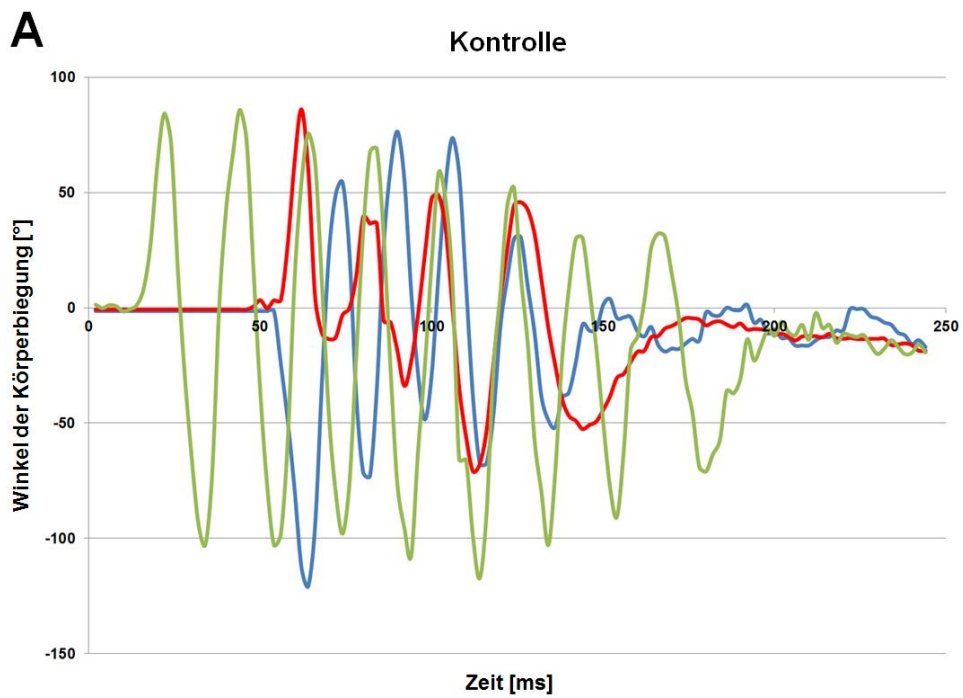


Abbildung 22: Apparativer Aufbau des Motorneuronentoxizitäts-Assays (links) und die verwendete Hochgeschwindigkeits-Kamera (MotionBLITZ EoSens mini1).

Die aufgenommenen Videos werden mit einer speziellen Software (programmiert auf MATLAB-Basis) prozessiert. Zum Zeitpunkt 0 ms der Aufnahme werden Kopfspitze, Dottersack und Schwanzspitze manuell markiert. Diese Punktmarkierungen werden über den Verlauf des Videos automatisch verfolgt, Winkel werden je nach Auslenkungsrichtung mit positiven oder negativen Vorzeichen versehen und eine .csv-Datei wird ausgegeben. Diese .csv-Dateien können beispielsweise in Excel oder Origin importiert werden, um Graphen wie in Abbildung 23 zu erstellen. Exemplarisch wurden die Proteasominhibitoren BSc4999 **29** und Bortezomib **7** 2,5 Stunden mit 3 dpf alten Zebrafisch-Larven inkubiert. Jede Larve erfährt in gleichen zeitlichen Abständen 3 Nadel-Stimuli an der Schwanzspitze. Im Rahmen eines Experiments wird dieses Vorgehen an einer zweiten Larve wiederholt. Zusätzlich muss jedes Experiment ein weiteres Mal unabhängig und unter identischen Bedingungen durchgeführt werden, um Reproduzierbarkeit des Vorgehens zu gewährleisten.



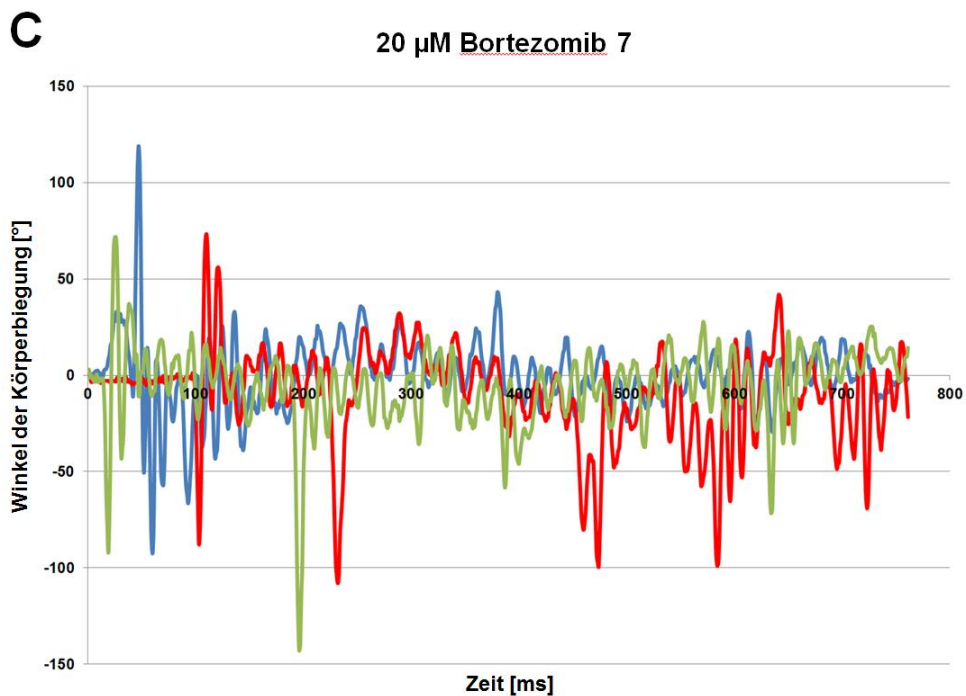


Abbildung 23: Graphen kinematischer Analysen des Fluchtreflexes von 3 dpf alten Zebrafischlarven. Jede Abbildung steht für eine exemplarische Larve, die dreimal stimuliert wurde. Die aufgezeichneten Fluchtreflexe der Nadel-Stimuli sind in unterschiedlichen Farben aufgetragen. **A** und **B** zeigen gesundes Fluchtverhalten, charakterisiert durch zunächst starke, später abklingende Amplituden der Körperbiegung in regelmäßiger Frequenz. Die Larve reagiert unmittelbar nach bzw. wenige ms nach dem Stimulus und kommt zwischen 200 ms und 500 ms zur Ruhe. **A** zeigt die Reaktion einer Kontroll-Larve, die Larve aus **B** wurde 2,5 Stunden in einer 200 μ M BSc4999-Lösung in E3-Medium inkubiert. Unter identischen Bedingungen und höheren Konzentrationen ($c \geq 300 \mu\text{M}$) des Proteasominhibitors **29** wird Apoptose ausgelöst und die Larve stirbt. **C** zeigt den Fluchtreflex einer Larve unter identischen Bedingungen nach Inkubation in einer 20 μ M Bortezomib-Lösung. Unregelmäßig starke und unkoordinierte Ausschläge des Winkels der Körperbiegung über längere Zeiträume bis zu 1 s deuten auf Schädigung der Nerven der Larve durch den Wirkstoff **7**.

Die Messdaten werden zur Bestimmung der Körperauslenkungsamplitude, -frequenz und Kontraktionsgeschwindigkeit verwendet und ermöglichen die Quantifizierung sensorischer Innervierung der Larve. Im Falle von Proteasominhibitoren führt der Nachweis neurotoxischer Wirkung zur frühzeitigen Aussortierung des Wirkstoffs, da das Auftreten schwerer Nervenkrankheiten in weiterführenden Studien als Begleiterscheinung der Behandlung nicht auszuschließen ist.

Vorsicht: Muskelschädigende Wirkstoffe können durch dieses Assay nicht von neurotoxischen Substanzen unterschieden werden, sodass bei dem Gebrauch endgültiger Aussagen bezüglich möglicher Nebenwirkungen Vorsicht geboten ist. Allerdings führt eine

eventuelle muskelschädigende Wirkung einer Substanz auch zur Aussortierung, da dies ebenfalls kein wünschenswerter Nebeneffekt eines neuen Wirkstoff-Kandidaten ist.

5.8 Anwendungsbeispiel Resveratrol

Resveratrol **31** ist ein Naturstoff, der unter anderem in Nüssen und Früchten vorkommt. Die polyphenolische Verbindung gehört zu den weltweit am intensivsten untersuchten Naturstoffen. Studien über den Konsum von Resveratrol **31** berichten von krebspräventiven^[97] und lebensverlängernden^[98-99] Effekten, über kardio-^[100] und neuroprotektive^[101] Wirkung, bis hin zur Modulation der Reaktion von Gewebe auf ionisierende Strahlung. Von letzterem wird in unterschiedlichen Studien sogar von protektiven^[102] und sensitivierenden^[103] Eigenschaften von **31** berichtet. Unter dem Begriff „Französisches Paradox“ findet Resveratrol **31** neben einigen anderen Inhaltsstoffen von Wein immer wieder öffentliches Interesse durch Berichterstattung der internationalen Presse.^[104] Dies trägt auch dazu bei, dass Studien über positive Effekte des Polyphenols **31** fortwährend in Fachjournalen publiziert werden.

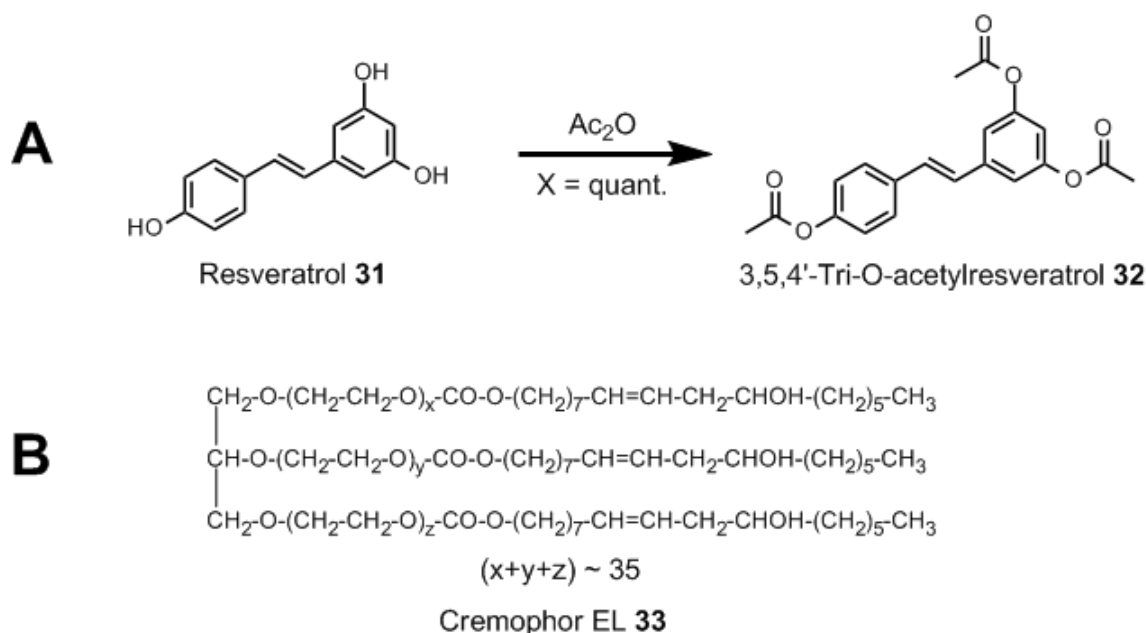


Abbildung 24: **A** zeigt die Struktur von Resveratrol **31** und den Syntheseweg zum Derivat 3,5,4'-Tri-O-acetylresveratrol **32**. **B** zeigt die Struktur des Lösungsvermittlers Cremophor EL **33**.

Im Kontext der vielseitigen Wirkungen von Resveratrol **31** sind wir auf eine interessante Arbeit aus dem Jahr 2011 gestoßen.^[102] Koide et al. berichten von einer radioprotektiven Wirkung der Substanz **31** bzw. von dessen acetylierten Derivat 3,5,4'-Tri-O-acetylresveratrol **32** als potentiell Pro-Pharmakon. Resveratrol **31** könnte aufgrund anti-oxidativer

Eigenschaften in der Lage sein, durch ionisierende Strahlung erzeugte, ROS/RNS abzufangen. Demnach könnten **31** bzw. **32** Menschen helfen, die unter permanenter Belastung einer radioaktiv verseuchten Umgebung leiden oder zum Schutz des gesunden Gewebes während einer Bestrahlungstherapie dienen. Die Studie beinhaltet, neben der Bestrahlung eines Wirkstoff-inkubierten Zellsystems *in vitro*, die Bestimmung der Überlebensrate von Mäusen *in vivo*, welchen 10 min vor und 10 min nach γ -Bestrahlung die Wirkstoffe **31** und **32** injiziert wurden. Die durchgeführten Experimente sollten prüfen, inwiefern sich die Verabreichung des triacetylierten Pro-Pharmakons **32** auf die Halbwertszeit und radioprotektive Wirkung einer Dosis im lebenden Organismus im Vergleich zum reinen Wirkstoff Resveratrol **31** auswirken (Abbildung 25).

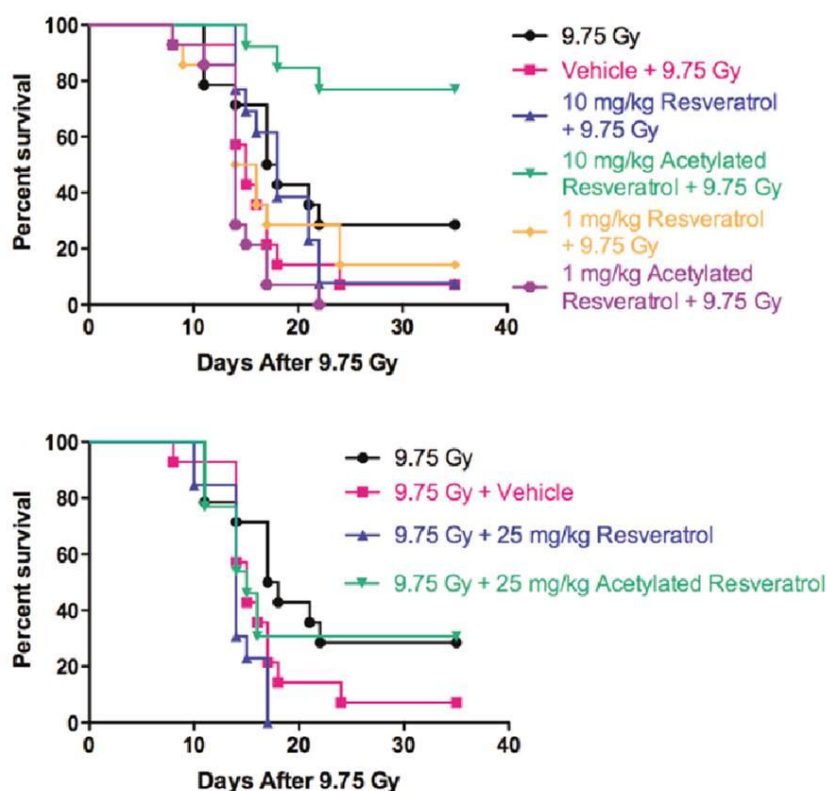


Abbildung 25: Original Daten aus der Veröffentlichung von Koide et al.^[102] Resveratrol **31** und acetyliertes Resveratrol **32** wurden in einer Mischung aus Ethanol/Cremophor EL **33**/Wasser (1:1:8 v/v/v) gelöst. Oben: Die Injektion an C57BL/6NHsd Mäuse (n = 13 oder 14 pro Dosis) erfolgte intraperitoneal mit 1 oder 10 mg/kg **31** oder **32**. 10 min nach der Injektion erfolgte eine γ -Bestrahlung von 9,75 Gy. Unten: Im zweiten Experiment wurde gelöstes **31** bzw. **32** erstmals 10 min nach der Bestrahlung und 4 weitere Tagesdosen an den 4 darauf folgenden Tagen injiziert. Adapted with permission for both print and electronic formats from K. Koide, S. Osman, A. L. Garner, F. Song, T. Dixon, J. S. Greenberger, M. W. Epperly, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 270-274. Copyright 2011 American Chemical Society.

Es fällt auf, dass beide Substanzen **31** und **32** vor Injektion in einer Mischung aus Ethanol/Cremophor EL **33**/Wasser gelöst werden. Cremophor EL **33** ist ein

Lösungsvermittler, der zur Formulierung schwach wasserlöslicher Wirkstoffe verwendet werden kann.^[105] Anwendungsgebiete von **33** reichen von Anästhetika, Sedativa und Immunsuppressiva, bis hin zu anti-Krebsmitteln. Beispielsweise ist Paclitaxel (Taxol) ein anti-Krebsmittel, das mit hohen Mengen von **33** appliziert wird. Aufgrund nachträglich durchgeführter Studien wird mittlerweile kritisch diskutiert, inwiefern Cremophor EL **33** selbst bzw. Wechselwirkungen von Paclitaxel mit **33** für die heftigen Nebenwirkungen des Medikaments verantwortlich sein könnten. Cremophor EL **33** ist nachweislich kein inerter Lösungsvermittler.^[105] Ferner wird die Verwendung von **33** als Wirkstoffzusatz mit Nebenwirkungen in Form von anaphylaktoiden Überempfindlichkeitsreaktionen, Hyperlipidämie, Aggregation von Erythrozyten und mit *Peripherer Neuropathie* in Verbindung gebracht. Auch die bereits erwähnte Arbeit von Koide hinterlässt offene Fragen bezüglich der Verwendung von **33**. Aus Abbildung 25 wird eine radioprotektive Wirkung der zuvor injizierten Mischung aus 10 mg/kg acetyliertem Resveratrol **32** gelöst in Ethanol/Cremophor EL **33**/Wasser (1:1:8 v/v/v) deutlich. Dies wird mit einer erhöhten Hydrolyse-Stabilität der Ester-Gruppen von 3,5,4'-Tri-O-acetylresveratrol **32** im Komplex mit Cremophor EL **33** begründet. Hierzu werden allerdings keine unterstützenden Experimente gezeigt. Es bleibt unklar, ob es eventuell zu einer Micellen-Bildung kommt und inwiefern diese für einen radioprotektiven Effekt verantwortlich sein könnte. Was ist denn nun das tatsächliche Pro-Pharmakon? Ist es ein Komplex aus Cremophor EL **33** und acetylierten Resveratrol **32**, möglicherweise als Micelle vorliegend? Ist das hydrolysierte Produkt Resveratrol **31** tatsächlich die anti-oxidativ wirkende Spezies oder spielt die Hydrolyse in einem Cremophor-Komplex überhaupt keine Rolle? Sollte das nachweislich biologisch aktive Cremophor EL **33** nicht durch einen inerten Löslichkeitsvermittler ersetzt werden? Und warum wird in der Arbeit von Koide nicht darauf eingegangen, dass im Kontrollexperiment die Injektion des Cremophor-haltigen Trägers einen deutlich radiosensitivierenden Effekt im Vergleich zur unbehandelten Maus zufolge hat (Abbildung 25)?

Mit der Motivation herauszufinden welche Wirkung Resveratrol **31** und dessen acetyliertes Derivat **32** ohne Cremophor EL **33**-Zusätze am lebenden Organismus hat, sollte eine toxikologische Evaluation am Zebrafisch-Embryonen-Bestrahlungsassay erfolgen. Hierbei wurde streng nach den in Abschnitt 5 vorgestellten Prozeduren vorgegangen. Resveratrol **31** wurde hierzu kommerziell erworben. Die Acetylierung von **31** erfolgte durch sechsstündige Reaktion mit Acetanhydrid unter Rückfluss. Nach Zugabe eines vielfachen Volumenanteils an

Methanol, konnte Triacetylresveratrol **32** nach Verdampfung des Lösemittels in quantitativer Ausbeute isoliert werden (Abbildung 24).

Die Durchführung eines Bestrahlungs-Experiments setzt die Ermittlung der nicht-toxischen Konzentrations-Obergrenze des jeweiligen Wirkstoffs voraus. Hierzu wurde für **31** und **32** das in Abschnitt 5.5 beschriebene Vorgehen des DarT-Tests durchgeführt. Es konnten weder für **31** noch für **32** toxische Phänotypen beobachtet werden. Jede Testreihe entwickelte sich identisch mit den Kontrollgruppen in E2-Medium. Hier ist die korrekte Interpretation des Ergebnisses wichtig: Keine Toxizität im DarT-Test zu beobachten bedeutet nicht zwingend, dass der Wirkstoff untoxisch ist. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass der Wirkstoff nicht in der Lage war das schützende Chorion zu passieren oder über die Haut des 1 dpf alten Embryos aufgenommen zu werden. Erst der Nachweis eines beliebigen Effekts des Wirkstoffs ist ein Nachweis für dessen Permeabilität. Dies kann durch gezielte Verabreichung von Überdosen im DarT-Test realisiert werden. Für **31** waren keine Effekte bis zur Löslichkeits-Obergrenze von 100 µM in E2-Medium nachweisbar, im Falle von **32** lag die Löslichkeits-Obergrenze in E2-Medium von < 10 µM deutlich niedriger, was diesen Ansatz limitierte.

Es folgte die Durchführung des Bestrahlungsexperiments nach der Vorschrift aus Abschnitt 5.6 der Wirkstoffe **31** und **32** in unterschiedlichen Konzentrationsreihen, bis hin zu deren Löslichkeits-Obergrenzen in E2-Medium. Sowohl ein nachweisbar radioprotektiver, also auch radiosensibilisierender Effekt, wären zusätzliche Beweise für die Permeabilität der Wirkstoffe gewesen. Ein solcher Effekt blieb allerdings für beide Wirkstoffe **31** und **32** aus, sodass sich folgende Fragestellung ergab: Zeigen **31** und **32** keine modulierenden Effekte auf ionisierende Strahlung im Zebrafisch-Assay oder wird die Durchführung des Assays durch mangelnde Permeabilität der Wirkstoffe **31** und **32** limitiert? Um diesbezüglich Klarheit zu schaffen wurden die in Abschnitt 5.5 beschriebenen Permeabilitäts-Nachweis-Experimente durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass die Wirkstoffe **31** und **32** unter den geforderten Bedingungen keine Permeabilität zum Organismus der Zebrafischlarve aufweisen. Sogar das aufwändige HPLC-ESI-Verfahren aus Abschnitt 5.5 konnte keinerlei Spuren des Wirkstoffs nachweisen. Aus verschiedenen Quellen ist bekannt, dass HPLC-ESI-Analyse ein sensitives Verfahren für den qualitativen Nachweis von Resveratrol **31**-Spuren darstellt.^[106-108]

Prinzipiell können dem Embryo Wirkstoffe via Mikroinjektion^[76] verabreicht werden. Dieses Vorgehen ist aufwändig, vor allem wenn eine hohe Anzahl an Organismen in Replikaten und unabhängigen Experiment-Gruppen zur Generierung statistisch verwertbarer Ergebnisse

erwünscht sind. Ein guter Ansatz ist ein automatisiertes und reproduzierbares Injektions-Verfahren, das hier Abhilfe schaffen könnte.^[109]

Es konnte gezeigt werden, dass das Zebrafisch-Embryonen-Modell unter den verwendeten Bedingung nicht geeignet ist, um die Fragestellungen, die sich aus der Publikation von Koide ergeben,^[102] zufriedenstellend zu beantworten. Dennoch sollten weitere Kontrollexperimente, wie etwa die Testung der zahlreichen bekannten Cremophor EL **33**-freien Formulierungsalternativen,^[105, 110] durchgeführt werden, bevor die Mischung aus dem umstrittenen Cremophor EL **33** und dem Resveratrol-Derivat **32** verfrüht für weiterführende Studien am Menschen vorgeschlagen wird.

6 Literaturverzeichnis

- [1] M. Biel, V. Wascholowski, A. Giannis, *Angewandte Chemie* **2004**, 116, 6574-6576.
- [2] D. P. Lane, *Nature* **1992**, 358, 15-16.
- [3] A. Ehlinger, K. J. Walters, *Biochemistry* **2013**, 52, 3618-3628.
- [4] L. Borissenko, M. Groll, *Chemical Reviews* **2007**, 107, 687-717.
- [5] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, 386, 463-471.
- [6] M. Groll, W. Heinemeyer, S. Jager, T. Ullrich, M. Bochtler, D. H. Wolf, R. Huber, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96, 10976-10983.
- [7] W. Heinemeyer, M. Fischer, T. Krimmer, U. Stachon, D. H. Wolf, *The Journal of biological chemistry* **1997**, 272, 25200-25209.
- [8] I. Schechter, A. Berger, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, 27, 157-162.
- [9] A. K. Nussbaum, T. P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanovic, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D. H. Wolf, R. Huber, H. G. Rammensee, H. Schild, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95, 12504-12509.
- [10] P. M. Kloetzel, F. Ossendorp, *Current Opinion in Immunology* **2004**, 16, 76-81.
- [11] M. Bochtler, L. Ditzel, M. Groll, R. Huber, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, 94, 6070-6074.
- [12] E. M. Huber, M. Groll, *Angewandte Chemie* **2012**, 51, 8708-8720.
- [13] S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, K. Tanaka, *Science* **2007**, 316, 1349-1353.
- [14] M. Orłowski, C. Cardozo, C. Michaud, *Biochemistry* **1993**, 32, 1563-1572.
- [15] A. F. Kisselev, W. A. van der Linden, H. S. Overkleeft, *Chemistry & Biology* **2012**, 19, 99-115.
- [16] E. Shaw, *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **1990**, 63, 271-347.
- [17] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, 268, 533-539.
- [18] E. Seemuller, A. Lupas, D. Stock, J. Lowe, R. Huber, W. Baumeister, *Science* **1995**, 268, 579-582.

-
- [19] H. A. Braun, S. Umbreen, M. Groll, U. Kuckelkorn, I. Mlynarczyk, M. E. Wigand, I. Drung, P.-M. Klotzel, B. Schmidt, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 28394-28401.
- [20] S. Tsubuki, Y. Saito, M. Tomioka, H. Ito, S. Kawashima, *Journal of Biochemistry* **1996**, *119*, 572-576.
- [21] T. Nazif, M. Bogoy, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 2967-2972.
- [22] M. Bogoy, S. Shin, J. S. McMaster, H. L. Ploegh, *Chemistry & Biology* **1998**, *5*, 307-320.
- [23] H. Ovaa, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebiger, A. M. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, H. S. Overkleeft, *Angewandte Chemie* **2003**, *42*, 3626-3629.
- [24] J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y. T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 333-338.
- [25] J. L. Thompson, *The Annals of pharmacotherapy* **2013**, *47*, 56-62.
- [26] C. R. Berkers, M. Verdoes, E. Lichtman, E. Fiebiger, B. M. Kessler, K. C. Anderson, H. L. Ploegh, H. Ovaa, P. J. Galardy, *Nature Methods* **2005**, *2*, 357-362.
- [27] S. Arastu-Kapur, J. L. Anderl, M. Kraus, F. Parlati, K. D. Shenk, S. J. Lee, T. Muchamuel, M. K. Bennett, C. Driessen, A. J. Ball, C. J. Kirk, *Clinical Cancer Research* **2011**, *17*, 2734-2743.
- [28] L. M. Martins, A. Morrison, K. Klupsch, V. Fedele, N. Moiso, P. Teismann, A. Abuin, E. Grau, M. Geppert, G. P. Livi, C. L. Creasy, A. Martin, I. Hargreaves, S. J. Heales, H. Okada, S. Brandner, J. B. Schulz, T. Mak, J. Downward, *Molecular and cellular biology* **2004**, *24*, 9848-9862.
- [29] O. A. O'Connor, A. K. Stewart, M. Vallone, C. J. Molineaux, L. A. Kunkel, J. F. Gerecitano, R. Z. Orlowski, *Clinical Cancer Research* **2009**, *15*, 7085-7091.
- [30] D. S. Siegel, T. Martin, M. Wang, R. Vij, A. J. Jakubowiak, S. Lonial, S. Trudel, V. Kukreti, N. Bahlis, M. Alsina, A. Chanan-Khan, F. Buadi, F. J. Reu, G. Somlo, J. Zonder, K. Song, A. K. Stewart, E. Stadtmauer, L. Kunkel, S. Wear, A. F. Wong, R. Z. Orlowski, S. Jagannath, *Blood* **2012**, *120*, 2817-2825.
- [31] M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P.-M. Klotzel, R. Huber, M. Groll, *Angewandte Chemie* **2011**, *123*, 563-566.
- [32] M. L. Stein, H. Cui, P. Beck, C. Dubiella, C. Voss, A. Krüger, B. Schmidt, M. Groll, *Angewandte Chemie* **2014**, *53*, 1679-1683.
- [33] S. Chatterjee, D. Dunn, S. Mallya, M. A. Ator, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9*, 2603-2606.

-
- [34] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- [35] H. S. T. Khalil, H.; Chakarov, S.; Zhelev, N.; Lane, D.P., *Biodiscovery* **2012**, *1*, 1-13.
- [36] S. Burma, B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, D. J. Chen, *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 42462-42467.
- [37] J. P. Carney, R. S. Maser, H. Olivares, E. M. Davis, M. Le Beau, J. R. Yates Iii, L. Hays, W. F. Morgan, J. H. J. Petrini, *Cell* **1998**, *93*, 477-486.
- [38] A. Celeste, O. Fernandez-Capetillo, M. J. Kruhlak, D. R. Pilch, D. W. Staudt, A. Lee, R. F. Bonner, W. M. Bonner, A. Nussenzweig, *Nature cell biology* **2003**, *5*, 675-679.
- [39] K.-P. Hopfner, A. Karcher, L. Craig, T. T. Woo, J. P. Carney, J. A. Tainer, *Cell* **2001**, *105*, 473-485.
- [40] Q. Wang, H. Zhang, R. Fishel, M. I. Greene, *Oncogene* **2000**, *19*, 6152-6158.
- [41] W. Wu, A. Koike, T. Takeshita, T. Ohta, *Cell division* **2008**, *3*, 1.
- [42] S. J. Boulton, *Biochemical Society transactions* **2006**, *34*, 633-645.
- [43] S. Banin, L. Moyal, S.-Y. Shieh, Y. Taya, C. W. Anderson, L. Chessa, N. I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, Y. Ziv, *Science* **1998**, *281*, 1674-1677.
- [44] M. Gatei, K. Sloper, C. Sorensen, R. Syljuasen, J. Falck, K. Hobson, K. Savage, J. Lukas, B. B. Zhou, J. Bartek, K. K. Khanna, *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278*, 14806-14811.
- [45] S. Matsuoka, G. Rotman, A. Ogawa, Y. Shiloh, K. Tamai, S. J. Elledge, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 10389-10394.
- [46] S. Y. Shieh, J. Ahn, K. Tamai, Y. Taya, C. Prives, *Genes & development* **2000**, *14*, 289-300.
- [47] J. T. Powers, S. Hong, C. N. Mayhew, P. M. Rogers, E. S. Knudsen, D. G. Johnson, *Molecular cancer research : MCR* **2004**, *2*, 203-214.
- [48] R. P. Sahu, S. Batra, S. K. Srivastava, *British journal of cancer* **2009**, *100*, 1425-1433.
- [49] J. Y. Wang, *Oncogene* **2000**, *19*, 5643-5650.
- [50] W. H. McBride, K. S. Iwamoto, R. Syljuasen, M. Pervan, F. Pajonk, *Oncogene* **2003**, *22*, 5755-5773.
- [51] F. Pajonk, J. Himmelsbach, K. Riess, A. Sommer, W. H. McBride, *Cancer Research* **2002**, *62*, 5230-5235.
- [52] P. W. Atkins, *Physical Chemistry*, 6 ed., Wiley-VCH, **1998**.

-
- [53] fluorophores.org.
- [54] S. Burgold, T. Bittner, M. M. Dorostkar, D. Kieser, M. Fuhrmann, G. Mitteregger, H. Kretzschmar, B. Schmidt, J. Herms, *Acta Neuropathologica* **2011**, 121, 327-335.
- [55] A. Boländer, D. Kieser, C. Voss, S. Bauer, C. Schön, S. Burgold, T. Bittner, J. Hölzer, R. Heyny-von Haußen, G. Mall, V. Goetschy, C. Czech, H. Knust, R. Berger, J. Herms, I. Hilger, B. Schmidt, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**.
- [56] A. Boländer, D. Kieser, C. Scholz, R. Heyny-von Haussen, G. Mall, V. Goetschy, C. Czech, B. Schmidt, *Neurodegenerative Diseases* **2013**.
- [57] X. Chen, X. Tian, I. Shin, J. Yoon, *Chemical Society Reviews* **2011**, 40, 4783-4804.
- [58] D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, 8, 579-591.
- [59] C. Borek, *The Journal of nutrition* **2004**, 134, 3207S-3209S.
- [60] B. M. Sutherland, P. V. Bennett, H. Schenk, O. Sidorkina, J. Laval, J. Trunk, D. Monteleone, J. Sutherland, *Physica Medica* **2001**, 17 Suppl 1, 202-204.
- [61] H. Pelicano, D. Carney, P. Huang, *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2004**, 7, 97-110.
- [62] S.-K. Ko, X. Chen, J. Yoon, I. Shin, *Chemical Society Reviews* **2011**, 40, 2120-2130.
- [63] H. Ohshima, M. Tatemichi, T. Sawa, *Archives of biochemistry and biophysics* **2003**, 417, 3-11.
- [64] A. M. Shah, K. M. Channon, *Heart (British Cardiac Society)* **2004**, 90, 486-487.
- [65] K. J. Barnham, C. L. Masters, A. I. Bush, *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, 3, 205-214.
- [66] S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, D. A. Wessels, D. M. Flaherty, *Free radical biology & medicine* **1999**, 27, 146-159.
- [67] L.-C. Lo, C.-Y. Chu, *Chemical Communications* **2003**, 2728-2729.
- [68] M. C. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 15392-15393.
- [69] E. M. Deuchar, *Biological Reviews* **1972**, 47, 37-112.
- [70] D. Schneider, *Nature Reviews Genetics* **2000**, 1, 218-226.
- [71] T. Kaletta, M. O. Hengartner, *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5, 387-399.


-
- [72] J. Drake, C. D. Link, D. A. Butterfield, *Neurobiology of aging* **2003**, 24, 415-420.
- [73] C. D. Link, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, 92, 9368-9372.
- [74] B. R. Ellerbrock, E. M. Coscarelli, M. E. Gurney, T. G. Geary, *Journal of biomolecular screening* **2004**, 9, 147-152.
- [75] A. R. Burns, I. M. Wallace, J. Wildenhain, M. Tyers, G. Giaever, G. D. Bader, C. Nislow, S. R. Cutler, P. J. Roy, *Nature Chemical Biology* **2010**, 6, 549-557.
- [76] http://zfin.org/zf_info/zfin_stats.html.
- [77] C. N.-V. R. Dahm, *Zebrafish*, 1 ed., Oxford University Press, **2001**.
- [78] K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G. J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais, J. A. Guerra-Assuncao, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J. H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliot, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, B. Mortimore, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthravadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, et al., *Nature* **2013**, 496, 498-503.
- [79] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, T. F. Schilling, *Developmental Dynamics* **1995**, 203, 253-310.
- [80] M. Westerfield, *The Zebrafish Book*, 4 ed., University of Oregon Press, **2000**.
- [81] R. Creton, *Brain research. Developmental brain research* **2004**, 151, 33-41.
- [82] K. Henn, T. Braunbeck, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **2011**, 153, 91-98.
- [83] G. Gellert, J. Heinrichsdorff, *Water research* **2001**, 35, 3754-3757.
- [84] R. Alshut, R. Mikut, J. Legradi, U. Liebel, U. Strähle, G. Bretthauer, M. Reischl, *at - Automatisierungstechnik* **2011**, 59, 259-268.
- [85] R. Nagel, *ALTEX: Alternatives to Animal Experimentation* **2002**, 19 Suppl 1, 38-48.

-
-
- [86] E. Lammer, G. J. Carr, K. Wendler, J. M. Rawlings, S. E. Belanger, T. Braunbeck, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* **2009**, 149, 196-209.
- [87] S. Basu, C. Sachidanandan, *Chemical Reviews* **2013**, 113, 7952-7980.
- [88] T. P. Dick, A. K. Nussbaum, M. Deeg, W. Heinemeyer, M. Groll, M. Schirle, W. Keilholz, S. Stevanovic, D. H. Wolf, R. Huber, H. G. Rammensee, H. Schild, *The Journal of biological chemistry* **1998**, 273, 25637-25646.
- [89] M. Unno, T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka, T. Tsukihara, *Structure* **2002**, 10, 609-618.
- [90] G. Cumming, F. Fidler, D. L. Vaux, *The Journal of Cell Biology* **2007**, 177, 7-11.
- [91] R. F. Hagemann, L. L. Schenken, T. C. Evans, *The Journal of Investigative Dermatology* **1969**, 52, 277-279.
- [92] A. Bensimon, R. Aebersold, Y. Shiloh, *FEBS letters* **2011**, 585, 1625-1639.
- [93] K. C. Cuneo, L. Geng, A. Fu, D. Orton, D. E. Hallahan, A. B. Chakravarthy, *International journal of radiation oncology, biology, physics* **2008**, 71, 873-879.
- [94] M. Niyazi, C. Maihoefer, M. Krause, C. Rodel, W. Budach, C. Belka, *Radiation Oncology* **2011**, 6, 177.
- [95] B. Daroczi, G. Kari, M. F. McAleer, J. C. Wolf, U. Rodeck, A. P. Dicker, *Clinical Cancer Research* **2006**, 12, 7086-7091.
- [96] T. M. Khan, N. Benaich, C. F. Malone, R. L. Bernardos, A. R. Russell, G. B. Downes, M. J. Barresi, L. D. Hutson, *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* **2012**, 17, 76-89.
- [97] M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, J. M. Pezzuto, *Science* **1997**, 275, 218-220.
- [98] J. A. Baur, K. J. Pearson, N. L. Price, H. A. Jamieson, C. Lerin, A. Kalra, V. V. Prabhu, J. S. Allard, G. Lopez-Lluch, K. Lewis, P. J. Pistell, S. Poosala, K. G. Becker, O. Boss, D. Gwinn, M. Wang, S. Ramaswamy, K. W. Fishbein, R. G. Spencer, E. G. Lakatta, D. Le Couteur, R. J. Shaw, P. Navas, P. Puigserver, D. K. Ingram, R. de Cabo, D. A. Sinclair, *Nature* **2006**, 444, 337-342.
- [99] K. J. Pearson, J. A. Baur, K. N. Lewis, L. Peshkin, N. L. Price, N. Labinskyy, W. R. Swindell, D. Kamara, R. K. Minor, E. Perez, H. A. Jamieson, Y. Zhang, S. R. Dunn, K. Sharma, N. Pleshko, L. A. Woollett, A. Csiszar, Y. Ikeno, D. Le Couteur, P. J. Elliott, K. G. Becker, P. Navas, D. K. Ingram, N. S. Wolf, Z. Ungvari, D. A. Sinclair, R. de Cabo, *Cell metabolism* **2008**, 8, 157-168.
- [100] S. Bradamante, L. Barengi, A. Villa, *Cardiovascular drug reviews* **2004**, 22, 169-188.

-
- [101] N. Singh, M. Agrawal, S. Dore, *ACS Chemical Neuroscience* **2013**, 4, 1151-1162.
- [102] K. Koide, S. Osman, A. L. Garner, F. Song, T. Dixon, J. S. Greenberger, M. W. Epperly, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 270-274.
- [103] Y. Fang, M. J. Bradley, K. M. Cook, E. J. Herrick, M. B. Nicholl, *Journal of Surgical Research* **2013**, 183, 645-653.
- [104] P. Kopp, *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **1998**, 138, 619-620.
- [105] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **2001**, 37, 1590-1598.
- [106] I. Kolouchová-Hanzlíková, K. Melzoch, V. r. Filip, J. Šmidrkal, *Food Chemistry* **2004**, 87, 151-158.
- [107] L. Mark, M. S. Nikfardjam, P. Avar, R. Ohmacht, *Journal of chromatographic science* **2005**, 43, 445-449.
- [108] R. Tsao, Z. Deng, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2004**, 812, 85-99.
- [109] W. Wang, X. Liu, D. Gelinas, B. Ciruna, Y. Sun, *PloS one* **2007**, 2, e862.
- [110] L. van Zuylen, J. Verweij, A. Sparreboom, *Investigational new drugs* **2001**, 19, 125-141.



7 Anhang



Constantin Voss

17.07.2014

Hauptstrasse 2a

69469 Weinheim

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

[Constantin Voss]



Constantin Voss

17.07.2014

Hauptstrasse 2a

69469 Weinheim

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

[Constantin Voss]



Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.